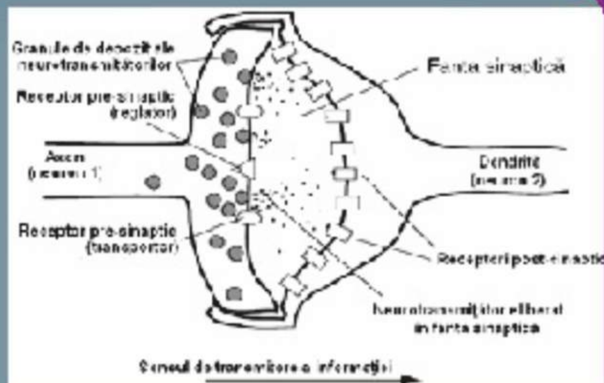
Romana Vulturar

Neurotransmiterea, procese biochimice și implicații în patologia genetică umană



Presa Universitară Clujeană

Romana Vulturar

Neurotransmiterea, procese biochimice și implicații în patologia genetică umană

Romana Vulturar

Neurotransmiterea, procese biochimice și implicații în patologia genetică umană

Ediția a II-a, revizuită și adăugită

Presa Universitară Clujeană

2021

Referenți științifici:

Prof. dr. Manuela Banciu

Dipl. Chim. dr. Călin Deleanu, CS I

ISBN 978-606-37-1143-5

Universitatea Babeş-Bolyai
Presa Universitară Clujeană
Director: Codruţa Săcelean
Str. Hasdeu nr. 51
400371 Cluj-Napoca, România
Tel./fax: (+40)-264-597.401
E-mail: editura@ubbcluj.ro
http://www.editura.ubbcluj.ro/

CUVÂNT ÎNAINTE

Neurotransmiterea și defectele din metabolismul neurotransmițătorilor aparțin unui domeniu actual; deficiențele cu etiologie monogenică afectând sinteza sau transportul unor neurotransmițători reprezintă o categorie de anomalii considerate inițial *„boli rare, netratabile, adesea fatale"*. Anomaliile monogenice afectând neurotransmițătorii sunt defecte încadrate în domeniul bolilor rare și, în ultimii ani, s-au înregistrat progrese remarcabile legate de metodele moderne de analiză; terapia disponibilă pentru anumite afecțiuni din acest grup le-a inclus (într-o proporție din ce în ce mai mare) în categoria unor *anomalii tratabile.* Ele rămân în continuare boli care pot evolua fie cu episoade acute - extrem de severe, fie ca forme intermitente de boală, ori cu un parcurs neurodegenerativ sever. Modificările biochimice care afectează metabolismul normal al neurotransmițătorilor cuprinde atât defecte care aparțin categoriei *bolilor rare*, *„orphan disease"* (cu o prevalență mai mică de 1:2 000 indivizi în populația generală), cât și defecte poligenice, cu mecanism complex, cum sunt cele legate de tulburările depresive.

Volumul de față este în cea mai mare parte o sinteză bibliografică și este o ediție revizuită și adăugită a ediției din 2017. În cursul stagiilor de rezident în specialitatea de genetică medicală, și a stagiului post-doctoral (într-o secție de boli genetice metabolice a Spitalului de copii - British Columbia Children's Hospital din Vancouver, Canada) am învățat noțiuni teoretice și practice legate de bolile monogenice care afectează primar sau secundar procesele de neurotransmitere. Aceste deficiențe au fost caracterizate la nivel molecular relativ recent, ca urmare a introducerii tehnicilor avansate de chimie analitică din genetica biochimică și, în paralel, a metodelor de genetică moleculară; s-a arătat ca unele dintre aceste anomalii afectează doar secundar metabolismul unor aminoacizi, fiind legate în primul rând de metabolismul monoaminelor, pterinelor, biotinei, a unor vitamine, de disfuncția unor organite citoplasmatice care afectează metabolismul energetic celular. Unele caracteristici comune sunt preluate din volumul *Aminoacidopatii, aspecte genetice, biochimice și clnice, autori R. Vulturar, M. Cucuianu*; în volumul de față sunt prezentate sumar și alte boli genetice care aparțin de asemenea anomaliilor monogenice, și care afectează secundar metabolismul cerebral (bolile de stocaj lisosomal, bolile congenitale de glicozilare, boli care afectează metabolismul energetic cum sunt mitocondriopatiile, boli afectând veziculele de secreție din neuroni ș.a.). Toate aceste patologii sunt cunoscute astăzi aparținând *Bolilor genetice de metabolism,* iar clasificarea acestora cu anumite caracteristici specifice este utilă celor implicați

în patologia clinică, dar și celor care sunt implicați în investigațiile de laborator destinate acestor boli rare. Astfel, revizuirea primei ediții (destinată medicilor, chimiștilor, biochimiștilor, biologilor care pot contribui în diagnosticul acestor patologii) adaugă referințe utile privind clasificarea actualizată a acestor boli, aspecte de fiziopatologie, reprezentări biochimice, etape diagnostice și includerea unor boli identificate mai recent. Cu ocazia acestei ediții, au fost corectate și anumite greșeli (de redactare, unele referitoare la citarea referințelor bibliografice) identificate în prima ediție.

Importanța cunoașterii metabolismului cerebral și al neurotransmiterii este evidentă și prin publicațiile recente referitoare la afecțiunile neuropsihice mai frecvente (tulburări depresive, tulburări de anxietate ș.a.) cu mecanisme complexe, doar parțial elucidate. Publicațiile din acest domeniu abordează procesele neurobiologice implicând metabolismul neurotransmițătorilor; de exemplu, "*Emotional Roles of Monoaminergic Neurotransmitters in Major Depressive Disorder and Anxiety Disorders*", Liu Yi și colab., 2018, "*Monoaminergic system and depression*", Perez-Caballero și colab., 2019. Terapia care acționează asupra neuronilor sau receptorilor din metabolismul serotoninei, norepinefrinei și dopaminei, așa cum sunt inhibitorii selectivi ai recaptării serotoninei (SSRI – *Selective Serotinin Reuptake Inhibtors*) care cresc concentrația sinaptică a serotoninei și respectiv SNRI (*Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors)* au demonstrat eficiență în terapia tulburării depresive majore, în tulburărille de anxietate. Recent, noi compuși care vizează alte sisteme implicate în metabolismul neurotransmiterii, cum este sistemul glutamatergic, au devenit centrul cercetării privind terapia antidepresivă cu acțiune rapidă (36, 70, 71, 88, 118).

Astfel de rezultate publicate de curând și având la bază descrierea mecanismelor moleculare cu ținte terapeutice nou identificate marchează importanța descifrării fiziopatologiei din bolile monogenice; acestea sunt esențiale atât pentru identificarea unor modalități de tratament eficiente în aceste boli monogenice, cât și pentru identificarea unor abordări terapeutice în bolile multifactoriale, complexe.

Mulțumesc în mod special doamnei Prof. Dr. Gabriella Horvath (din Spitalul Universitar British Columbia din Vancouver, specialist în boli genetice de metabolism, domnului Dr. Erik Gerlo (din Laboratorul de Genetică biochimică a Spitalului Universitar *Vrije University Hospital* Brussels, Belgia) care m-au îndrumat cu mult profesionalism pe parcursul unor luni de stagiu în secții clinice și de laborator; de asemenea, am beneficiat de sprijinul dumnealor prin colaborări în anii care au urmat.

Romana Vulturar,
medic primar genetică medicală

CUPRINS

Lista de abrevieri

AADC	Decarboxilaza L-aminoacizilor aromatici *(Aromatic L-Amino acid De Carboxylase)*
AC	Adenilat ciclaza
ACC	Acetil CoA carboxilaza
AGLM	Acizi grași cu lanț mediu- AGLM
AGAT	Arginin-glicin amidino-transferaza
AGLL	Acizi grași cu lanț lung- AGLL
AHB	Acid γ-hidroxibutiric (Acid 4-hidroxibutiric)
AKU	Alcaptonurie
Ala (A)	Alanină
AR	Autosomal recesiv
Arg (R)	Arginină
ARG-SUCC	Acidul arginino-succinic
Asn (N)	Asparagină
Asp (D)	Acid aspartic
ASL	Argininosuccinat liaza
ASS	Argininosuccinat sintetaza
BDNF	Factor neurotrofic derivat din creier (*Brain derived neurotrophic factor*)
BGM	Boală genetică de metabolism
BH_4	Tetrahidrobiopterina
BHE	Bariera hematoencefalică
CBS	Cistationin β-sintaza
CC	Corpi cetonici
CCG	Complexul de clivare a glicinei
α-CG	α-cetoglutarat
Cit	Citrulină
CK	Creatin kinaza
CPS	Carbam(o)ilfosfat sintetaza
CR	Carbonil reductaza
Cys (C)	Cisteină
DA	Dopamina
DBH	Dopamin β-hidroxilaza
DHPR	Dihidropteridin reductaza
DHSAA	Dehidrogenaza semialdehidei α-aminoadipice (antiquitina)

DRD	Distonie cu răspuns pozitiv la administrarea de L-dopa
GABA	Acid γ-aminobutiric
GAD	Decarboxilaza acidului glutamic
GAMT	Guanidinoacetat-N-metiltransferază
GAT	Transportorului GABA
GC	Cromatografie gazoasă
CDG	Defecte (tulburări) congenitale de glicozilare
Gln (Q)	Glutamină
Glu (E)	Acid glutamic
GLUT 1	Transportorul membranar 1 al glucozei
Gly (G)	Glicină/glicocol
GC	Cromatografie gazoasă (gaz cromatografie)
GC-MS	Gaz cromatografie - Spectrometrie de masă
GEM	Gliceril eter monooxigenaza
GTP	Guanozin 5′ trifosfat
GTPCH	Guanozintrifosfat ciclohidrolaza I
Hci	Homocitrulină
HGN	Hiperglicinemia noncetotică (*non- ketotic hyperglycinemia, NKH*)
His (H)	Histidină
HPA	Hiperfenilalaninemie
(Sdr.) HHH	Sindromul Hiperamoniemie + Hiperornitinemie + Homocitrulinurie
5-HIAA	Acid 5-hidroxiindolacetic
HPLC	Cromatografie lichidă de înaltă performanţă (*High Performance Liquid Chromatography*)
HVA	Acid homovanilic
Hyp	Hidroxiprolină
5-HT	5- Hidroxitriptamină (serotonină)
5-HTrp/5-HTP	5- Hidroxitriptofan
5-HTT	Transportorul 5-Hidroxitriptaminei (serotoninei) sau SERT
IEC	Cromatografie schimbătoare de ioni (*Ion Exchange Chromatography*)
Ile (I)	Izoleucină
kb	Kilobaze
Kyn	Kinurenină
Leu (L)	Leucină
Lys (K)	Lizină
Met (M)	Metionină

MCC	β-metilcrotonil CoA carboxilaza
m-His	Metil-histidină
NA	Noradrenalina
NAD	Nicotinamid-adenin dinucleotid
NAD+	Nicotinamid-adenin dinucleotid- forma oxidată
NADH	Nicotinamid-adenin dinucleotid, forma redusă
NMDA	N-metil-D-aspartat *(N-methyl-D-aspartate)*
NO	Oxidul nitric (EDRF - *Endothelial-derived relaxing factor)*
NOS	Sintetaza oxidului nitric
OCT	Ornitin carbam(o)il transferaza (sau ornitin transcarbamilaza, OTC)
3-OMD	3-ortometildopa
Orn	Ornitină
PAH	Fenilalaninhidroxilaza (*Phenylalanine hydroxylase*)
PC	Piruvat carboxilaza
PCC	Propionil CoA carboxilaza
PCD	Pterin 4α-carbinolamin dehidrataza
Phe (F)	Fenilalanină
Pea	Fosfoetanolamină
PKU	Fenilcetonurie (*Phenylketonuria*)
PLP	Piridoxal fosfat
Pro (P)	Prolină
PNPO	Piridox(am)in oxidaza
P5P	piridoxal-5 fosfat
P6C	delta piperidein-6-carboxilat;
PTPS	6-piruvoil tetrahidropterin sintetaza
q-BH_2	Quinonoid-dihidrobiopterina
RMN	Rezonanță Magnetică Nucleară
RPAT	Răspuns pozitiv la administrarea tetrahidrobiopterinei (BH_4)
SAH	Sulf-adenozilhomocisteina
SAM	SAM: Sulf-adenozilmetionina
Sar	Sarcozina
S-cys	Sulfocisteina
Ser (S)	Serină
SHMT	Serin hidroximetil transferaza
SM	Spectrometrie de masă
SR	Sepiapterin reductaza
SSADH	Dehidrogenaza semialdehidei succinice

Tau	Taurina
Thr (T)	Treonină
Trp (W)	Triptofan
TVMA	Transportorul vezicular monoaminic
Tyr (Y)	Tirozină
Val (V)	Valină
TVAAI	Transportorul vezicular al aminoacizilor cu rol inhibitor (sau, în lb. engl. ”*vezicular inhibitory amino acid transporter* “- VIAAT”)
VLA	Acid vanillactic
VMA	Acid vanilmandelic
VMAT2	Transportor vezicular de monoamine

I. INTRODUCERE PRIVIND PROCESUL DE NEUROTRANSMITERE

Funcționarea creierului depinde de capacitatea neuronilor de interconectare pentru a determina procese de stimulare (excitație) sau inhibiție a activității lor; acestea se realizează prin transmiterea sinaptică, proces care este mediat prin mesageri chimici numiți *neurotransmițători (NT)*. Neurotransmiterea poate fi astfel asimilată unui proces de conversie a unui semnal electric într-un semnal chimic (mediat de un moleculele de NT*)* și apoi din nou într-un semnal electric (14).

Există numeroase studii care au arătat că în creierul mamiferelor, neurotransmițătorii excitatori (stimulatori) care îndeplinesc aceste criterii sunt: *acetilcolina* și *acidul glutamic*, în timp ce acidul gamma-aminobutiric (*GABA*) și *glicina* sunt neurotransmițătorii majori de tip inhibitor. De asemenea, aminele biogene sunt neurotransmițători chimici esențiali, fiind reprezentați de catecolamine (*epinefrina*, *norepinefrina* și *dopamina*) și indolamine (*serotonina* și *melatonina*). NT sunt implicați în multe funcții cerebrale, începând de la cele privind reglarea temperaturii corpului și a pragului durerii, până la funcții motorii, cele legate de memorie, controlul comportamentului și altele. Alterările complexe privind metabolismul glicinei, a acidului gamma-aminobutiric (*GABA*), a acidului glutamic (glutamatului), serotoninei, norepinefrinei, sau dopaminei, au fost legate de patologii neurologice diverse cum sunt: depresia, demența, schizofrenia, boala Parkinson, anumite tipuri de epilepsie, boala Huntington, tulburările din spectrul autist. Tratamentul este specific și ține de specialitățile clinice (neurologie și psihiatrie), și abordează modularea funcției unor receptori, precum și biochimia neurotransmițătorilor. De asemenea, prin progresele semnificative ale metodelor de biologie moleculară, de biotehnologie, trebuie amintit că terapiile experimentale abordează proceduri cu celule stem sau terapia genică (9, 13, 21).

Procesul de neurotransmitere corespunde căii prin care neuronii comunică între ei sau cu alte celule din organism. Neuronii sunt celule speciale, cu structură și funcții legate de primirea informațiilor din mediul înconjurător sau de la alți neuroni. Corpul neuronului conține nucleul și organitele cito-

plasmatice necesare pentru sinteza proteinelor și alte reacții metabolice. Majoritatea neuronilor prezintă mai multe dendrite (care preiau informația – tip aferent) și o singură prelungire – de tip eferent - axonul care transmite informația de la corpul neuronal. Dendrite sunt prelungiri foarte ramificate, iar axonul este foarte lung, el poate atinge chiar lungimea de un metru. Corpul neuronal (cu dimensiuni medii de 70 μm) primește informațiile prin dendrite, iar depolarizarea membranei celulare (cu participarea ionilor Na^+ și K+ este esențială în transmiterea influxului nervos). Comunicarea dintre neuroni sau între un neuron cu alte tipuri de structuri se face prin sinapse (2, 14).

O sinapsă tipică constă dintr-un buton axonal presinaptic, o terminație dendritică postsinaptică, delimitând împreună un spațiul numit fantă sinaptică. "Prin rolul lor de mesageri ai informaţiei intercelulare, NT nu acţionează în interiorul unei celule, ci doar între celule; un prin proces este cel de sintetiză şi depozitare a NT în granule mici" (116), pregătite pentru secreția celulară; secreția sa este procesul de eliberare în spațiul sinaptic și se realizează din terminaţia axonică a neuronului pre-sinaptic (2, 65):

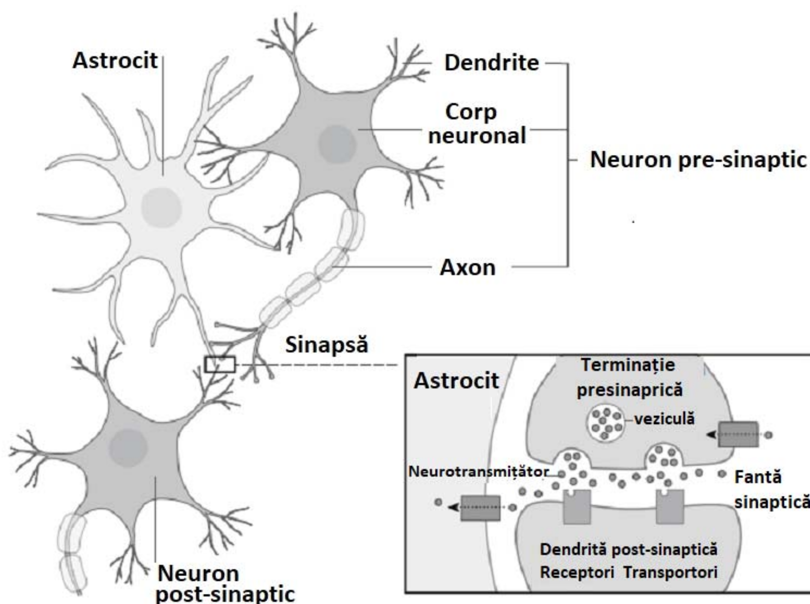


Fig. 1. Schema componentelor principale ale unei sinapse; neurotransmițătorii sunt îndepărtați din fanta sinaptică prin difuzie, absorbție sau degradare. Receptorii neurotransmițătorului postsinaptic sunt adesea canale de ioni sau sunt asociați cu canale de ioni (modif. după date din literatură – 63, 65)

Fanta sinaptică, delimitată între neuronul presinaptic și neuronul postsinaptic, face parte din spatiul extracelular al sistemului nervos central.
O varietate de molecule pot acționa ca neurotransmițători: aminoacizi, cum ar fi glutamatul (Glu) și acidul γ-aminobutiric (GABA), amine biogene (incluzând acetilcolina, serotonina și cele 3 catecolamine - dopamină, epinefrină, norepinefrină), nucleotide (de exemplu, adenozină), neuropeptide (de exemplu, substanța P) și chiar gaze (de exemplu, oxidul nitric- NO). Neurotransmițătorii acționează direct sau indirect Pentru controlul deschiderii canalelor ionice la nivelul neuronului postsinaptic sau a unui anumit țesut efector. Ei pot fi clasificate pe baza efectelor lor: neurotransmițătorii care provoacă depolarizare sunt clasificați ca *stimulatori* (excitatori), iar cele care provoacă hiperpolarizare sunt clasificați ca *inhibitori* (65, 69).

Astfel, organismul nostru utilizează substanțe de tip *neurotransmițători* pentru a transmite creierului informații despre mediul înconjurător, pentru analiza acestora și, în final, pentru a adapta răspunsul corespunzător al organismului la stimulii primiți. Creierul uman conține în special interneuroni care formează conexiuni între diferite regiuni cerebrale; ceea ce rezultă a fost asimilat unei *„conversații chimice"* necesare pentru utilizarea tuturor informațiilor depozitate cu formularea răspunsurilor la evenimente interne sau externe (12, 14).

Publicațiile din anii 1990 au estimat că la om creierul este format din aproximativ 100 de miliarde de neuroni, și că aceștia formează rețele şi conexiuni foarte numeroase (aproximativ 1000 sinapse/neuron). Neurotransmiţătorii stau la baza comunicării inter-neuronale, şi reprezintă molecule specifice prin care sunt transmise spre creier informaţii din mediul înconjurător, prin care se analizează aceste informaţii şi prin care se iniţiază răspunsul adecvat al organismului; ca urmare, cercetările actuale privind funcţia normală şi implicarea în patologie a acestor substanţe sunt foarte numeroase şi explică interesul mare al cercetătorilor pentru descifrarea mecanismelor implicate în funcţionarea creierului. Aceste rețele neuronale cuprind atât structuri (neuroni) care au fost implicați în perceperea inițială a experiențelor (informații din mediul exterior), precum și sisteme extinse neuronale care sunt implicate în căile de acces din regiunile de stocare a memoriei, sau din regiuni cerebrale superioare, corticale (1, 14).

Noţiunea de *neurotransmiţător* defineşte o moleculă biochimică eliberată de un neuron în vecinătatea receptorului său specific sau a unei celule

adiacente, asigurând astfel transferul de informaţie sub forma unei reglări sau modulări a potenţialului de repaus şi a ratei de descărcări în celula postsinaptică. Acest tip de substanțe sunt utilizate atât pentru comunicarea intracerebrală, cât și pentru cea de la nivelul măduvei spinării, sau pentru comunicarea cu alte tipuri de celule; de exemplu, cu celule ale glandelor endocrine (pentru eliberare unui hormon), cu fibre musculare pentru a induce contracția sa și a iniția mișcări. Procesele mai complexe, se referă la modul în care un anumit NT influențează comportamente. Înțelegerea acestora este importantă, și se studiază la nivelul unei unități structurale (cum este sinapsa), iar mai apoi, sunt apreciate la scară mai mare; aceste caracteritici sunt esențiale pentru a înțelege mecanismul normal de funcționare, dar și de a găsi medicamente care pot fi administrate eficient în modularea afecțiunilor ce țin de anomalii ale comportamentului (14, 116).

O clasificare privind tipul de implicații patologice cuprinde bolile monogenice legate de metabolismul NT (sinteză, transport, eliberare, recaptare, degradare), precum și anomaliile complexe, pentru care s-au identificat defecte mai extinse. Sunt descrise procese biochimice complexe care sunt implicate în dezvoltarea neurologică normală, iar fenomenele de biologie celulară implicate în neurodezvoltare sunt: dezvoltarea microgliale, vaselor de sânge (geneza vasculară), migrarea neuronală, dezvoltarea astrocitelor, formarea oligodendrocitelor, sinaptogeneza, mielinizarea, fenomenul de modificări sinaptice (*‚prunning'*) (109).

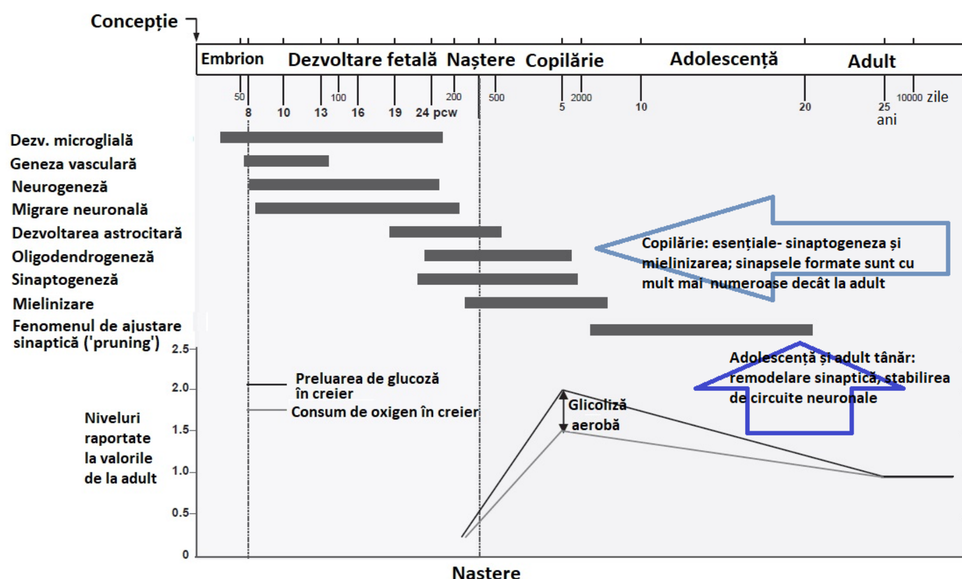


Fig. 2. Reprezentarea schematică a principalelor procese moleculare care au loc într-un anumit interval de devoltare neurologică; s-a arătat că procesele de neurodezvoltare ajung până în decada a treia de viață, și orice alterare a unui proces din parcursul reprezentat pe categorii de vârste produce tulburări de neurodezvoltare (schemă modificată după Steiner 2020 (9).

Acestor particularități li se adaugă intervenția microbiotei intestinale (cu o dezvoltare foarte importantă în primii ani de viață (3).Comunicarea dintre microbiota intestinală și creier poate implica nervul vag, terminații ale sistemului nervos vegetativ (simpatic), precum și neuropeptide (de tipul GABA, serotonina, neurotrofine cerebrale – de exemplu, BDNF- *brain derived neurotrophic factor*), sistemul neuroendocrin, neuropeptide secretate de intestin, și chiar citokine, unii metaboliți microbieni relevanți, cum sunt triptofanul și acizi grași cu lanț scurt de atomi de carbon (3, 14).

Au trecut peste 110 de ani de la publicarea articolului medicului englez Archibald Garrod cu titlul *Incidența alcaptonuriei: un studiu privind individualitatea chimică* (*"The Incidence of Alkaptonuria: A Study in Chemical Individuality"*) în care acesta menționează izolarea acidului homogentizic din urina bolnavilor cu alcaptonurie care a servit ca punct de plecare pentru cartea sa din 1909 intitulată *Bolile genetice de metabolism* (*„Inborn Errors of Metabolism"*). Astfel, Archibald Garrod a pus bazele *Geneticii biochimice*, iar în intervalul de peste 110 ani s-au identificat sute de astfel de anomalii rare (majoritatea afectând primar sau secundar creierul) și având caracter genetic (35, 94).

În ultimii ani s-au caracterizat la nivel molecular multe defecte din această categorie de boli, astfel că s-a ajuns la un total de peste 1300 anomalii monogenice metabolice cunoscute și s-a arătat că acest tip de patologie poate afecta orice proteină (aflată în citosolul celulelor, în plasmalemă sau situate extracelular, în interiorul sau în membrana organitelor citoplasmatice ori a veziculelor de transport) și având funcție de receptor, canal pentru transport, enzimă, cofactor enzimatic ș.a.) (83, 101, 121).

Încă din anii '90, pentru identificarea multor boli genetice de metabolism s-au elaborat și introdus metode performante de diagnostic biochimic în laboratoarele de genetică biochimică [bazate pe cromatografia schimbătoare de ioni (*Ion Exchange Chromatography* - IEC), cromatografia lichidă de înaltă performanță (*High Performance Liquid Chromatograhy* - HPLC), spectrometria de masă în tandem (TMS), gaz cromatografia cuplată cu MS (GC-MS), spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (NMRs)] ș.a. Aceste tipuri de investigații de chimie analitică se pot aplica în mod specific unor fluide biologice (plasmă deproteinizată, ser, urină, lichid cefalorahidian) cu separarea, identificarea și cuantificarea unor metaboliți – având caracter de *markeri specifici.* Modificările concentrațiilor acestor bio-markeri în anumite fluide biologice permite stabilirea diagnosticului biochimic pentru unele dintre aceste boli, iar identificarea acestor anomalii biochimice în primele zile de viață stă la baza „*screening*"-ului neonatal (metodologie care recomandă ca recoltarea probelor de sânge să fie făcută după 72 de ore de la naștere). Cu toate acestea, s-a arătat că nu toate aceste boli au în prezent un anumit marker biochimic identificabil în fluide ale organismului, și studiul mutațiilor genice poate fi esențial în aceste cazuri. În plus, este necesară monitorizarea clinică și biochimică a pacienților diagnosticați care pot beneficia de terapie ajustată permanent conform vârstei, particularităților fenotipice, și a patologiei asociate (9, 123).

În domeniul geneticii moleculare, s-au realizat progrese remarcabile care au permis abordări moderne prin analize de secvețiere genică (metoda *Sanger*) sau prin metode mai extinse – de tipul NGS (*Next-Generation Sequencing*) la nivelul exonilor din genom (*Whole Exome Sequencing* - WES) sau chiar de tip *Whole Genome Sequencing* (WGS); astfel, testele de genetică moleculară pot completa evaluarea clinică, și adesea au permis identificarea unor defecte noi (44, 123).

Deficiențele genetice (în special cele de tip monogenic) din metabolismul NT sunt recunoscute astăzi din ce în ce mai frecvent în etiologia unor encefalopatii metabolice severe, a căror debut se observă prin examinări clinice imediat după naştere (adesea chiar înainte de naștere prin metode imagistice performante) sau, și mai frecvent în primul an de viață. Diagnosticul de certitudine al acestor anomalii este adesea complex, necesită cel mai frecvent investigaţii avansate de chimie analitică a lichidului cefalorahidian și constituie o adevărată provocare. Astfel, diagnosticul acestor anomalii rămâne limitat clinicilor și laboratoarelor destinate bolilor genetice de metabolism, iar inițierea protocoalelor de analiză a depins atât de înțelegerea limitată a inter-relațiilor NT cu multitudinea de receptori, cât și de tipul de probă biologică disponibilă (lichidul cefalo-rahidian obținut prin puncție lombară fiind doar o „oglindă distală” a proceselor metabolice care au loc în creier). De-a lungul anilor, s-a arătat că analiza l.c.r. reflectă o perturbare generală care poate afecta biosinteza unui NT, degradarea sa, dar nu arată întotdeauna procesele metabolice specifice localizate într-o anumită structură sau corelate cu o anumită funcție cerebrală (13, 123).

II. ANOMALIILE GENETICE ALE NEUROTRANSMIȚĂTORILOR, DEFECTE APARȚINÂND BOLILOR GENETICE DE METABOLISM

II.1. Caracteristici generale privind structurile creierului (65):

Creierul este un organ remarcabil de complex atât ca structură, cât și ca funcție. La nivel macroscopic, creierul este împărțit în trei componente majore (65):
(1) trunchiul cerebral (care continuă măduva spinării, și conține bulbul, puntea și mezencefalul),
(2) cerebelul (cu cortexul său)
și
(3) emisferele cerebrale - sunt compuse din cortex cerebral, regiuni subcorticale cu substanță albă, ganglioni bazali și talamus, sistemul limbic, hipotalamus și glanda hipofiză.
Cortexul cerebral este cuprinde lobii frontali, parietali, lobi temporali și occipitali:

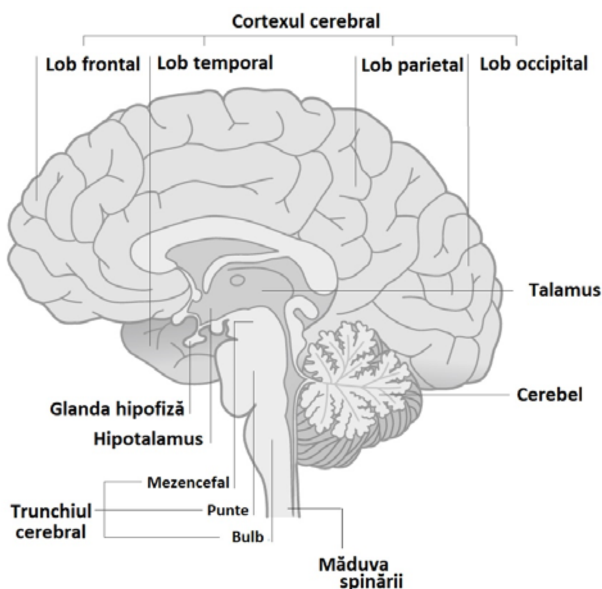


Fig. 3. Reprezentarea principalelor elemente macroscopice, componentele creierului (modif. după date din literatură- 65, 109)

La nivel microscopic, există două tipuri de celule (2, 65):
(1) neuroni (care primesc, procesează și transmit informații prin impulsuri electrice și biochimice, modificări mediate parțial de neurotransmițători,
și
(2) celule gliale, care sunt un grup divers de celule de susținere pentru neuroni, a căror roluri numeroase în funcționarea creierului sunt încă incomplet elucidate.

Legat de funcțiile structurilor din creier, trunchiul cerebral conține nucleii necesari pentru funcțiile autonome, cum ar fi reglarea frecvenței bătăilor cardiace, controlul respirației etc. Majoritatea nervilor cranieni, care asigură funcții motorii și senzoriale din interiorul craniului au originea în interiorul trunchiului cerebral. Funcționarea optimă a creierului necesită un metabolism bine coordonat; s-a arătat că sistemele extra-cerebrale elimină cataboliții toxici și protejează creierul de perturbări metabolice bruște. O implicație semnificativă în patologia metabolică evoluând cu afectarea cerebrală se referă la crizele de hipermoniemie – consecințe ale unor boli genetice metabolice sau ale unor difuncții hepatice dobândite - care pot afecta ireversibil structurile cerebrale prin moleculele de amoniac care străbat rapid BHE afectând metabolismul cerebral (63, 85, 99, 123).

Nutrienții necesari pentru buna funcționare a creierului vor ajunge în lichidul cefalorahidian; sunt asigurați prin circulația sanguină, însă aceștia trebuie să traverseze bariera hematoencefalică (BHE); BHE este structurată prin participarea celulelor endoteliale cu joncțiunile strânse caracteristice, a capilarelor cerebrale, lamina bazală și prelungirile celulelor gliale numite astrocite. Astrocitele și întregul sisem (BHE) protejează cel mai frecvent structurile neuronilor de metaboliții toxici prin prevenirea transportului acestora spre creier (5, 63, 65).

II.2. Caracteristici generale privind bolile genetice de metabolism

Metabolismul corespunde totalităţii reacţiilor chimice incluse în procesul continuu de degradare a unor substanţe cu origine exo- sau endogenă, dar și de înnoire a ţesuturilor unui organism. Pe de-o parte, enzimele joacă un rol indispensabil prin îndeplinirea rolului lor catalitic în conversia unui compus în altul, prin consumul energetic (cum este ATP-ul); pe de altă parte, este

esențială și contribuția cofactorilor enzimatici, sau a unor molecule transportoare trans-membranare (63, 92, 123).

Legat de enzime, toate aceste molecule au cel puţin două domenii fizico-chimice: unul sau mai multe domenii de legare a substratului, şi cel puţin un domeniu catalitic (74).

Bolile genetice de metabolism (BGM) numite şi *erori înnăscute de metabolism* după termenul în limba engleză *„inborn errors of metabolism"* (IEMs) sunt anomalii descrise pentru prima dată la începutul secolului XX. Astfel, observațiile lui Garrod care a publicat între anii 1902-1908 articole privind particularitățile observate la pacienți cu anumite boli genetice de metabolism au fost prioritare, iar termenul său de „individualitate chimică" stă la baza observațiilor ulterioare legate de această patologie de genetică biochimică, și mai apoi de medicină moleculară (35, 94, 98).

Aceasta categorie de boli corespunde, în conceptul clasic, categoriei de defecte moleculare cauzate de mutaţii care codifică sistemele enzimatice implicate în metabolismul aminoacizilor, glucidelor sau acizilor graşi, precum şi bolilor cauzate de mutaţii ale genelor care afectează metabolismul unor cofactori enzimatici sau/și metabolismul energetic mitocondrial. În plus, transportul rapid al unor metaboliţi la nivelul unor membrane celulare sau subcelulare este facilitat de proteine specifice de transport care funcţionează similar enzimelor (respectând cinetica de tip Michaelis-Menten). De aceea, mutaţiile genelor corespunzătoare acestor sisteme vor afecta funcţia sau numărul acestor transportori printr-un mecanism identic celui care explică afectarea genetică a enzimelor din metabolismul intermediar, şi având în final consecinţe similare. Prin urmare, şi aceste deficienţe au fost incluse în BGM (50, 100).

"Datele din literatura internațională arată că prevalența BGM considerate în mod individual nu este mare; de aceea au fost cuprinse în termenul de *„boli rare"*, sau *orphan disease*" (116). O apreciere generală arată că există în lume, la ora actuală peste 7050 de tipuri de boli rare. "Estimările recente arată că, la un anumit moment, o proporţie de cca 6-10% din comunitate suferă de o boală rară" (116) sau, o boală rară afectează mai puţin de 5 persoane din 10 000 de indivizi (care corespunde raportului de 1:2 000). În plus, conform aprecierii lui Guillem 2008, în Europa există peste 20 de milioane de indivizi afectaţi de această categorie de boli (62, 116); în plus, o problemă semnificativă este cea a influenței senescenței pentru cei cu astfel de deficiențe, sau doar purtători ai unor alele genice de risc (105, 123).

Căile biologice (cu reacţii enzimatice, cu procese de transport molecular de tip activ sau pasiv) nu sunt izolate; "limitele acestor căi sunt adesea definite arbitrar, iar o anumită cale biologică în aparenţă restrânsă poate fi uşor considerată de fapt un fragment al unei căi cu mult mai extinse; astfel, un element final al unei căi poate afecta evenimentele anterioare în lanţul de reacţii prin intermediul mecanismelor de control de tip „feed-back" acţionând prin modificări ale expresiei genice e unei anumite enzime" (116). Toate acestea conduc la ideea conceptului de *reţea reglatoare* care subliniază conexiunea şi interdependenţa diferitelor structuri şi căi metabolice din organismele animale:

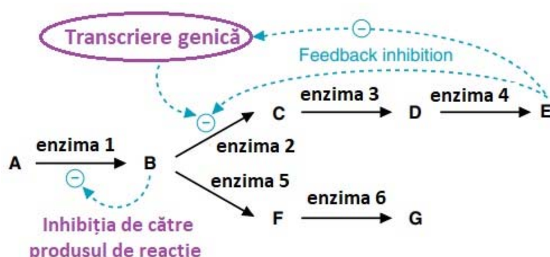


Fig. 4. Reprezentarea unui model comun pentru reacții enzimatice normale și reglarea prin mecanism de tip *feedback* a anumitor reacții metabolice (după date din literatură -, biochimie, alberts)

Literele B-G reprezintă compuși formați din diferite enzime din calea metabolică. Compusul B se află la un punct de ramificare metabolică: poate continua pe o cale spre compusul E, sau pe o cale alternativă către produsul G. Produsul final al căii, E, ar putea controla propria sinteză prin inhibarea alosterică a enzimei 2, primul pas angajat al căii, sau prin inhibarea transcrierii genei pentru enzima 2. Ca urmare a feedback-ului negativ, substanța B se acumulează și intră pe calea de conversie spre G, care ar putea fi o cale de stocare sau eliminare. În această cale ipotetică, B este un inhibitor al enzimei 1, competitiv față de A. Precursorul A ar putea induce sinteza enzimei 1, ceea ce ar permite ca o cantitate mai mare din substanța A să fie metabolizată spre substanța G (1, 97).

"În ultimii ani a apărut conceptul de tip '*omics*' care este un termen desemnat pentru analiza completă a sistemelor biologice prin care se studiază o cale metabolică în întregime. Analiza de tip '*omics'* corespunde unei abordări metodologice moderne: de la analiza unei singure gene, a unei proteine sau a unei reacţii metabolice, la un nivel extins de studiu în care întregul genom,

componentele proteice sau o întreagă cale metabolică sunt studiate simultan. Principala trecere la era '*omics*' a fost confirmarea secvențierii complete a genomului uman. Nevoia de stocare şi analiză a acestor informaţii a stimulat dezvoltarea instrumentului bioinformatic care contribuie semnificativ la dezvoltarea disciplinelor '*omics*' (genomica, transcriptomica, proteomica, metabolomica ş. a.). În ciuda unei istorii relativ scurte, această metodologie complexă şi-a dovedit eficiența prin progresul făcut de înțelegerea de către cercetători a proceselor fiziologice şi fiziopatologice care aduc speranță în stabilirea unor diagnostice biomedicale complexe şi tratamente cât mai eficiente. Studiul atent al bolilor Mendeliene în era genomică ne-a arătat deja faptul că, identificarea genotipului nu este un predictor suficient al consecinţelor clinice; trebuie luate în considerare componentele amintite ca rezultat al interacțiunii G x E, deci ale „fenomicii" (sau *phenomics* – expresia unui anumit genotip combinat cu efectele influenţelor specifice din mediu). Dacă observaţiile clinice sunt variante ale metabolomicii sau proteomicii în exprimarea fenotipică, atunci aceasta corespunde unei componente a „fenomicii" pe care o căutăm. Principala sarcină a proiectului intitulat *„Human Phenome Project"* a fost colectarea informaţiilor fenotipice (la diverse niveluri: molecule, celule, țesuturi şi organisme) cu stabilirea modului în care aceste date pot fi corelate în mod eficient. O altă sarcină a acestui proiect este legată de dezvoltarea formelor potrivite de depozitare a seturilor de date fenotipice, ale celor genotipice, precum şi ale celor legate de expunerea la factorii de mediu " (116).

BGM constituie un tip de patologie care poate afecta atât adultul, dar în special pe cea a copilului şi se referă la disfuncţia unei (sau rareori a mai multor) proteine din metabolismul celular. Studiile biochimice și genetice realizate în domeniul acestor anomalii au permis descifrarea unor mecanisme moleculare care explică deficienţele caracteristice acestor anomalii. BGM sunt afecţiuni care, considerate individual, au o frecvenţă mică; dacă sunt apreciate împreună, aceste boli sunt mult mai numeroase. Multe dintre aceste boli determină dizabilităţi intelectuale, fizice şi uneori moarte la o vârstă mică (17, 123).

O schemă generală care include consecinţele primare apărute în cazurile BGM arată că există 6 tipuri de defecte caracteristice bolilor genetice de metabolism (BGM) care pot fi schițate în funcție de localizarea defectului primar care va produce consecințe metabolice.

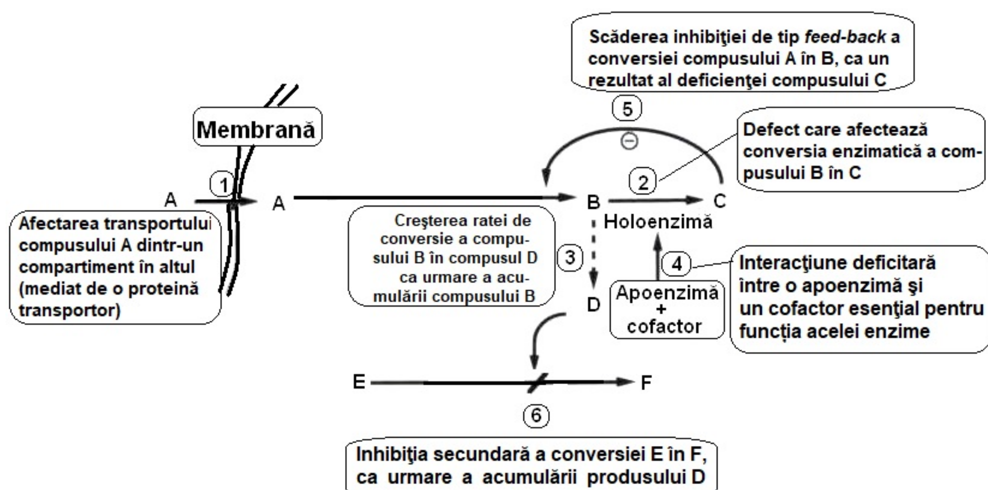


Fig. 5. Reprezentarea tipurilor de mecanisme implicate în fiziopatologia din cadrul unor defecte genetice ale unor enzime sau transportori membranari (schemă modificată după 15, 29, 81).

Consecinţele acestor defecte moleculare pot fi (123):

- deficienţa unor compuşi esenţiali,
- acumularea unor produşi toxici cu afectarea mai multor organe.

O parte dintre aceste boli sunt însă tratabile; de aceea, introducerea recentă în unele ţări a testării la de tip screening extins la naştere a tuturor nou-născuţilor („*screening*" neo-natal) pentru un număr variabi (25- 50) de boli genetice de metabolism prin metode analitice moderne (spectrometria de masă în tandem) utilizând doar câteva spoturi de sânge (recoltate la cca 72 de ore de la naştere de la nivelul latero-plantar al noului-născut - v. fig. alăturată, pe o hârtie de filtru specială) permite diagnosticul unor astfel de boli în faza presimptomatică cu posibilitatea iniţierii terapiei precoce pentru aceste afecţiuni (82, 94).



Fig. 6. Ariile latero-plantare utilizate pentru prelevarea spoturilor de sânge pentru „screening"-ul neonatal (modif. după date din literatură- 98, 123)

Pe de altă parte, un aspect important se referă la *„screening"-ul selectiv* al copiilor sau adulților – în care investigaţiile de specialitate pentru identificarea unei boli genetice de metabolism sunt indicate pornind de la semnele şi simptomele clinice, iar probele biologice (plasmă, ser, urină sau chiar l.c.r.) sunt analizate în mod selectiv, doar pentru anumiți metaboliți. În ciuda abundenţei de cazuri noi raportate, există multe date care arată că unele boli genetice de metabolism rămân nediagnosticate. S-a arătat că există o serie de semne şi simptome numite „*cheie*" în diagnosticul unor astfel de boli şi care sunt adesea subevaluate (98, 123).

În plus, trebuie ţinut cont de faptul că, anumite boli din această categorie de anomalii pot afecta sistemul nervos în mod secundar, și pot deveni clinic manifeste în anumite circumstanţe. Astfel, o schematizare a celor mai importante relaţii *factori declanşatori (trigger)* şi *tipul de boală genetică de metabolism* sunt reprezentate în tabelul următor (8, 55, 123).

Tabel I. Relaţia factori declanşatori – boală genetică de metabolism (majoritatea afectând sistemul nervos central): (după date din literatură 8, 55, 86, 123):

FACTORI DECLANŞATORI (FACTORI *'TRIGGER'*)	AFECȚIUNEA METABOLICĂ
Vărsături, post alimentar prelungit, infecţii, febră, vaccinare, traumatisme fizice, intervenții chirurgicale	Alterări în metabolismul proteic (inclusiv tulburări în ciclul ureei) Defecte ale glicolizei sau gluconeogenezei, homeostazia endocrină
Aport proteic crescut sau catabolism proteic crescut	Aminoacidopatii Acidemii organice Defecte ale ciclului ureic Sindromul Hiperamonemie-hiperinsulinism
Adm. de medicamente sub formă de lichidă (conțin și sirop cu fructoză), introducerea fructelor la vârsta diversificării alimentare, adm. de zahăr (sucroză)	Intoleranţa ereditară la fructoză

Lactoză, produse lactate	Galactozemie
Aport excesiv de grãsimi	Defecte de oxidare a acizilor graşi, deficit de lipoprotein lipazã, intoleranță la glicerol
Administrarea de medicamente	Porfirie, deficiența Glucozo-6-fosfat dehidrogenazei
Efort fizic intens	Defecte de oxidare a acizilor graşi, defecte ale glicolizei, ale glicogenolizei musculare, defecte în metabolismul purinelor/ pirimidinelor, defecte ale lanțului respirator mitocondrial

În centrele specializate privind diagnosticul şi terapia BGM, modificările biochimice constatate prin diverse metode analitice aplicate fluidelor organismului (cel mai frecvent urină, sânge, şi uneori lichid cefalorahidian) sau uneori prin studiul enzimatic la nivelul leucocitelor sau fibroblastelor (cultivate în laborator în urma biopsiei cutanate) pot fi urmate de investigaţii moleculare de analiză a mutaţiilor în moleculele de ADN. De multe ori însă, analizele biochimice de tip *„screening"* nu sunt disponibile pentru diagnosticul unei categorii de BGM; în acest caz, o apreciere clinică este obligatorie înainte de a solicita investigaţii biochimice sau moleculare sofisticate. Această caracteristică este importantă şi trebuie considerată atât în patologia pediatrică, cât şi în cea a adultului (98, 103).

"Informaţii ştiinţifice legate de BGM se pot obţine accesând baza de date internaţională care cataloghează bolile genetice cu transmitere de tip Mendelian, la adresa *http://www.ncbi.nlm.nih. gov/omim*, în care OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) corespunde unui catalog elaborat în anul 1966 (şi actualizat odată cu noile descoperiri) de profesorul Victor McKusic de la Universitatea Johns Hopkins din Baltimore, SUA" (116).

II.3. Scurt istoric, repere

Pornind cu contribuțiile lui Garrod menționate anterior, descifrarea patogenezei bolilor genetice de metabolism (BGM) a fost jalonată de mai multe momente de referinţă. O schematizare sumară, parcurge următoarele repere (116):

- ”Introducerea termenului *„Inborn errors of metabolism”* în 1908 de către medicul englez Archibald Garrod (1857-1936) care a publicat monografia cu acelaşi titlu în anul 1923 şi a descris alcaptonuria, albinismul, cistinuria si pentozuria, demonstrând că aceste enzimopatii respectă transmiterea ereditară conform legilor lui Mendel.
- În anii 1930, fenilcetonuria (PKU) apare din ce în ce mai clar ca o boală asociată retardului mental, şi cu un profil biochimic modificat faţă de normal; acest profil a fost explicat de Fölling în 1934 şi Penrose în 1935 printr-un fenotip homozigot mutant pentru o condiţie transmisă conform legii Mendeliene de tip autosomal recesiv”.

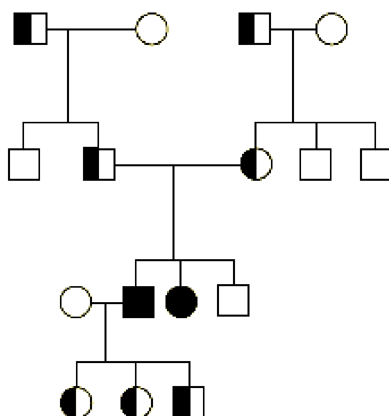


Fig. 7. Model al transmiterii autosomal recesive
(după date din literatură - 103, 104)

- Introducerea conceptului „o *genă - o enzimă*” (susţinut de Beadle si Tatum, 1945), modificat ulterior pentru a include şi consecinţele asupra altor proteine (hormoni, receptori, proteine transportoare, factori de coagulare etc.) sub forma *„un cistron – un polipeptid*”. Astăzi se știe că fenomenul de înnădire alternativă (sau *„alternativ splicing*”) aduce o variabilitate privind expresia genică, și în plus, genomul nostru cuprinde cu mult mai multe secvențe reglatoare implicate în reglarea exprimării genice (2).
- ”Definirea conceptului de *„boală moleculară*” (Pauling si Ingram, 1945) introdus cu ocazia stabilirii defectului structural al lanţului β al hemo-

globinei din anemia produsă de deformarea în seceră a eritrocitelor (siclemia) ” (116).

- ”Lionel Penrose (1898-1972) a fost un important psihiatru, matematician şi genetician în Anglia, şi a contribuit la înțelegerea fenilcetonuriei; interesul său deosebit pentru cauzele retardului mental l-a condus la presupunerea că afectarea mentală a pacienţilor fenilcetonurici netrataţi are o cauză biochimică endogenă (116)”.
- ”În anii 1950, s-a arătat că activitatea enzimatică a fenilalaninhidroxilazei (PAH) hepatice este deficitară la pacienţii cu PKU (Jervis, 1953), iar Bickel şi colab. (1954), Woolf şi colab. (1955), respectiv Armstrong şi Tyler (1955) au arătat că fenotipul metabolic în PKU poate fi tratat prin dieta restrictivă în fenilalanină, cu potenţialul de a preveni retardul mental” (116). Astfel, fenilcetonuria a oferit un nou model privind abordarea medicală a bolilor genetice de metabolism, această boală fiind astăzi binecunoscută ca fiind *„una dintre primele boli genetice umane pentru care există un tratament eficient” (30, 31, 116).*
- ”În anii 1960, s-a pus la punct un test simplu de laborator care îndeplineşte condiţiile necesare unui „*screening*” pentru nou-născuţi (Guthrie şi Susi, 1963) în vederea diagnosticării fenilcetonuriei; acest program s-a extins în întreaga lume pentru a permite un diagnostic timpuriu şi instituirea terapiei care să prevină retardul mental la pacienţii cu PKU. Astfel, PKU a devenit un prototip pentru „*screening*”-ul genetic la nivel populaţional (National Academy of Sciences, *Committee for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, 1975) cu importanţă în programele de sănătate publică” (116).
- În etapa actuală există metode performante de dozare a unor metaboliţi biochimici în fluide biologice (utilizând metode moderne de cromatografie gazoasă sau lichidă, schimbătoare de ioni, metode de spectrometrie de masă, spectroscopie RMN, ş.a.). S-au identificat deficiențe genetice ale metabolismului cofactorului enzimei PAH (tetrahidrobiopterina notat BH_4) care poate afecta și metabolismul unor neurotransmițători (51, 60). În plus, prin tehnicile actuale de genetică moleculară, incluzând și analizele de secvențiere perfecționate după definitivarea hărţii genomului uman, a devenit posibilă localizarea mutaţiilor în genele responsabile pentru aceste boli; de asemenea se încearcă o coroborare a datelor de analize genomice de tip WGS (*Whole*

Genome Sequencing) sau *Whole Exome sequencing* (WES) cu datele de tip „metabolomics" obținute prin analize de spectrometrie de masă și spectroscopie RMN pentru a putea identifica modul detaliat de funcționare a sistemelor biologice (16, 123).

II.4. Clasificarea actuală a bolilor genetice de metabolism

Așa cum s-a arătat în mai multe publicații, clasificarea actualizată a BGM ține cont de abordarea fiziopatologică (100, 101).

Identificarea anuală de noi defecte care aparțin acestei patologii a permis o apreciere legată de tipul sistemului afectat cel mai frecvent. Astfel, o sinteză realizată de Prof. J.M. Saudubray a arătat că din totalul celor 300 de "noi" defecte genetice de tip BGM identificate în intervalul anilor 2011-2016, circa 85% afectează predominant creierul. Procesele de neurodezvoltare deficitară și neurodegenerare pot fi observate deopotrivă, iar tabloul clinic heterogen poate uneori să nu asocieze modificarea unor biomarkeri. Progresele recente de genetică moleculară permit uneori identificarea mutațiilor cauzatoare de boală (100).

Astfel, clasificarea simplificată a BGM care ia în calcul atât elemente de diagnostic, cât și particularități fiziopatologice și terapie, consideră trei mari categorii de BGM, bazate pe mărimea moleculelor afectate („mici și simple" sau „mari și complexe"), precum și implicația lor în metabolismul energetic. Pe de altă parte, s-a arătat recente că oricare ar fi dimensiunea lor, metaboliții implicați în BGM se pot comporta la nivel cerebral ca: molecule de semnalizare, componente structurale sau substrat energetic ("combustibil"), și mulți metaboliți au mai mult de un rol (87, 101, 123).

Neurometabolismul devine din ce în ce mai relevant, nu numai în legătură cu aceste noi categorii de boli, ci și ca o modalitate necesară de a explica mecanismele de afectare a creierului în categoriile definite clasic ca fiind boli genetice de metabolism. Metabolismul creierului, care a fost în mare parte neglijat în abordarea tradițională a investigării și tratării bolilor neurologice, este un criteriu major și nu trebuie neglijat nici în neurologie și nici în neuroștiințe. Așa cum arată autorii mai multor publicații, biochimia (metabolismul) și neurobiologia celulară trebuie considerate ramuri care se interconectează (100, 101).

O mare parte dintre aceste boli afectează dezvoltarea sistemului nervos fie într-o manieră directă, fie secundar, iar descoperirile recente au permis elaborarea clasificării mai simplificate bazate pe criterii fiziopatologice și perspective terapeutice, foarte utile atât în laborator, cât mai ales specialităților clinice; astfel, aceste boli sunt grupate în 3 mari categorii (101):

I. Tulburări ale moleculelor mici (peste 300 de tipuri, reprezentând cca 23% din totalul BGM):
   - Acumulări (cauzate de un catabolism deficitar – fiziopatologic au caracteristici de „intoxicație") – peste 200 de tipuri;
   - Deficiențe ale unor molecule (în sinteză sau transport) – peste 100 de tipuri, incluzând și defecte genetice din metabolismul neurotransmițătorilor (de ex: defecte de sinteză afectând metabolismul GABA, monoaminelor, glicinei, serinei, glutamatului).

Particularități (116): "Bolile înnăscute ale metabolismului intermediar care duc la intoxicaţii acute sau progresive cauzate de acumularea produşilor toxici proximal de blocul metabolic. În acest grup sunt incluse:

- *aminoacidopatiile* și *majoritatea aciduriilor organice*
- *defectele din ciclul ureei*
- *defecte privind metabolismul unor glucide.*

Caracteristic acestor anomalii este faptul că, un interval de timp fără simptome este urmat de semnele intoxicaţiei acute sau cronice şi de perturbări metabolice recurente; prin urmare, expresia clinică este adesea tardivă şi intermitentă. Diagnosticul este stabilit prin metode de chimie analitică precum spectrometria de masă în tandem, metode cromatografice (de ex: cromatografia aminoacizilor plasmatici şi/sau urinari, a acizilor organici, respectiv a glucidelor). Terapia se adresează prevenirii formării sau îndepărtării metaboliţilor toxici".

II. Tulburări în metabolismul moleculelor complexe; peste 650 de tipuri, reprezentând cca 47% din totalul BGM (101):
   - Acumulări (catabolism, depozitare) – peste 80 de tipuri
   - Deficiențe ale unor molecule (în sinteză sau reciclare) - peste 300 de tipuri
   - Procesul de transport, procesare, verificare – peste 270 de tipuri

Particularități (116): "Bolile care perturbă sinteza sau catabolismul moleculelor complexe, implicând uneori anumite organite citoplasmatice legate de degradarea enzimatică:

- *bolile care afectează transportul intracelular şi procesul secretor proteic*.
- *bolile lisosomale,*
- *bolile peroxisomale.*

În toate aceste cazuri simptomele clinice sunt permanente, progresive, independente de evenimentele intercurente sau de aportul alimentar".

III. Tulburări afectând metabolismul energetic; peste 430 de tipuri de boli, reprezentând cca 30% din totalul BGM (101):
  - defecte de transport ale moleculelor cu rol energetic (12 tipuri),
  - defecte citoplasmatice (peste 60 tipuri)
  - defecte mitocondriale (peste 350 de tipuri)

Particularități (116): "Bolile „*deficienţelor energetice*" sunt cele în care tabloul clinic este datorat (cel puţin parţial) unei deficienţe în producerea sau utilizarea energiei, ca rezultat al unui defect înnăscut al metabolismului intermediar de la nivelul ficatului, miocardului, muşchilor scheletici sau creierului. În acest grup de boli sunt incluse:

- *glicogenozele,*
- *defectele de gluconeogeneză,*
- *acidemiile lactice congenitale,*
- *defectele de oxidare a acizilor graşi*
- *bolile lanţului respirator mitocondrial.*

Aceste boli prezintă o suprapunere a caracteristicilor clinice, cu manifestări care survin uneori din acumularea metaboliţilor toxici alături de deficienţa energetică. Tabloul clinic include: hipoglicemia, lactacidemia, hipotonia generalizată severă, miopatia, falimentul creşterii, insuficienţa cardiacă, şocul circulator, sindromul morţii infantile subite şi malformaţiile congenitale, ultimele sugerând că procesul patologic a afectat calea de producere a energiei încă din cursul vieţii fetale."

În sens classic, erorile înnăscute afectând metabolismul intermediar sunt defecte ale enzimelor metabolismului aminoacizilor, glucidelor, acizilor grași, sau afectează metabolismul energetic mitocondrial. Tulburările metabolismului intermediar sunt adesea dinamice; ele se u lutează cu modificări ale stării metabolice a pacient și permit frecvent o intervenție terapeutică cu

succes. Cele mai multe tulburări genetice afectând metabolismul intermediar se pot diagnostica pe baza investigațiiloe metabolice care includ analiza gazelor din sânge, glicemia, lactacidemia, amoniemia, dar și analiza amino-acizilor plasmatici, a acizilor organici urinari, și a unui profil al acilcarnitinelor din sânge (102, 123).

S-a arătat că anumite defecte (hiperglicinemii, respectiv deficiența transportorului de dopamină - cu acumularea de acid homovanilic în fanta sinaptică) se pot încadra mai curând ca defecte în metabolismul neuro-transmițătorilor, în spectrul tulburărilor de semnalizare, decât ca defect de tip „intoxicație". De fapt, în creier, moleculele care se acumulează se pot comporta ca molecule de semnalizare care activează căile biologice implicate în plasticitatea neuronală, excitabilitate și chiar în supraviețuirea neuronală (101).

În concluzie, așa cum s-a arătat în mai multe publicații, aplicarea spectrometriei de masă în tandem (TMS) în 'screening' -ul nou-născutului și diagnosticul prenatal a permis diagnosticul presimptomatic pentru unele BGM. Cu toate acestea, în multe cazuri, testele de 'screening' neonatal sunt fie prea lente, prea scumpe sau nesigure și, în consecință, o metodă simplă de 'screening' clinic este obligatorie înainte de a iniția investigații biochimice sofisticate.

Astfel, diagnosticul clinic al unei BGM se bazează pe un număr limitat de principii (79, 80, 102, 123):

a) Într-un anumit context clinic, trebuie să luăm în considerare și o BGM în paralel cu alte condiții mai frecvente
b) Simptomele care persistă și rămân inexplicabile după tratamentul inițial și după investigațiile obișnuite care au fost efectuate pentru tulburări mai frecvente, pot să fie datorate unei BGM.
c) Orice deces neonatal se poate datora unei BGM, în special în cazurile care au fost încadrate cu septicemie.
d) În plus, sepsisul adevărat poate declanșao decompensare acută atunci când există subiacent o BGM.
e) De examinat cu atenție toate rezultatele autopsiei.
f) Să evităm să confundam un simptom sau un sindrom cu etiologia care stă la baza unei BGM.
g) O BGM poate avea debut clinic la orice vârstă, începând din perioada fetală până la vârsta senectuții
h) Deoarece cea mai mare parte a BGM respectă trasmiterea autosomal recesivă, majoritatea cazurilor individuale apar sporadic (deși există și unele BGM cu transmitere dominantă, legată de X sau maternă).

i) În situația de urgență, se vor considera în primul rând acele BGM pentru care există tratament.
j) Se va avea în vedere solicitarea sprijinului din partea centrelor specializate în BGM.

III. DEFECTE GENETICE (PRIMARE) ÎN METABOLSMULUI NEUROTRANMIȚĂTORILOR

III.1. Defecte în metabolismul glicinei

Glicina sau glicocolul (Gly) este un aminoacid ne-esențial, cu structură simplă; acest aminoacid are un rol important în neurotransmitere, având în principal un rol inhibitor. Glicina este un intermediar în multe procese metabolice dar și unul dintre inhibitorii majori ai neurotransmiterii în sistemul nervos central. Receptorii inhibitori ai glicinei se găsesc mai ales în trunchiul cerebral și în măduva spinării. Catabolismul glicinei este realizat de complexul de clivare al glicinei (CCG) care, atunci când este deficitar (prin mutațiile care afectează în final complexul enzimatic CCG) produce boala numită hiperglicinemia noncetotică (HGN) marcată de creşterea concentraţiei Gly atât în plasmă şi urină, cât şi în l.c.r. (13, 116).

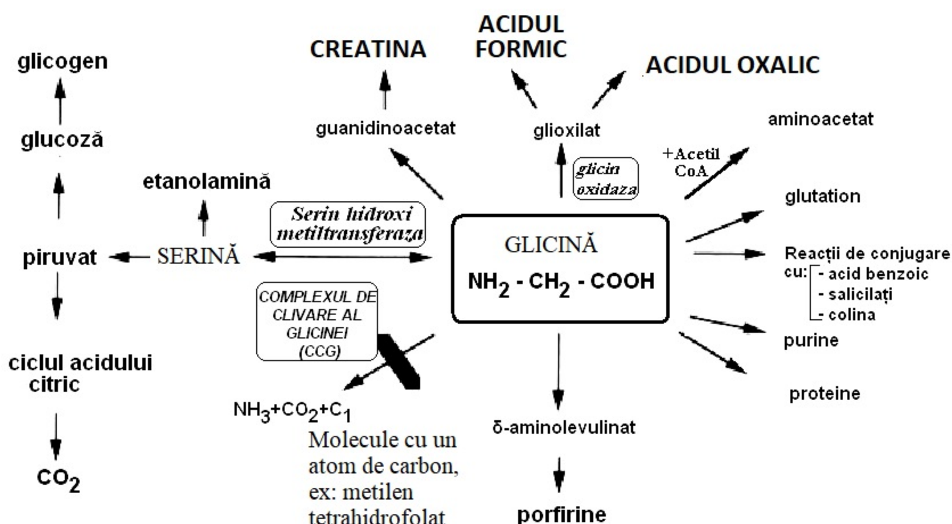


Fig. 8. Reprezentarea metabolismului glicinei cu marcarea locului de acțiune al complexului CCG (deficitar în cazul hiperglicinemiei noncetotice); schemă modif. după date din literatură, preluată din 116.

Studiile privind tipurile de neurotransmițători au arătat că ”la nivelul sistemului nervos central, glicina îndeplineşte funcţia de NT cu două tipuri de efecte (116):

1. ***Efect excitator al glicinei*** (la nivel cortical) prin intermediul receptorului *NMDA* (notat şi N-Metil-D-Aspartat).

Odată cu atașarea glutamatului sau N-metil-D-aspartatului la nivelul receptorului (care îndeplineşte atât funcţia de *„canal cu poartă comandat de ligand*", dar şi de *„canal cu poartă comandat de voltaj*"), canalul se deschide şi ionii de Na^+ şi Ca^{2+} intră în neuron.

Glicina se leagă la un alt nivel al receptorului, favorizează acelaşi mecanism urmat de influxul ionilor Na^+ şi Ca^{2+}, acţionând ca un facilitator al acestui transport. Studiul mecanismelor moleculare prin care se asigură funcţionarea normală a acestor receptori au arătat de curând şi importanţa serinei la nivelul acestor componente; o deficienţă privind funcţionarea acestor receptori (aşa cum se înregistrează prin stimularea excesivă exercitată de glicină) este răspunzătoare de crizele epileptice refractare la tratament şi de modificările cerebrale care apar în cursul *hiperglicinemiei noncetotice (HGN)*. Studiile recente de neuroembriologie au arătat că glicina şi serina exercită (prin activarea receptorilor glicinei) un rol foarte important în semnalizarea celulară şi maturizarea sinaptică din cursul dezvoltării fetale.

2. ***Efect inhibitor al glicinei*** (la nivelul măduvei spinării şi a trunchiului cerebral); acest efect este probabil responsabil de apneea şi spasmul diafragmatic (sughiţul) observate în primele zile de viață din cursul evoluţiei HGN care poate fi suspectată prin identificarea unei hiperglicinemii şi hiperglicinorahii semnificative" (116).

Moleculale transportor de glicină (GlyT-1 și GlyT-2) sunt membri ai superfamiliei transportorilor de neurotransmițători dependenți de Na^+/Cl^-. GlyT-2 din neuronul presinaptic este esențial pentru recaptarea glicinei în neuronul presinaptic și astfel oferă un substrat pentru reumplerea mediată de TVAAI a veziculelor re-endocitate. Izoforma acestui transportor, dar localizată în celule gliale (GlyT-1) îndepărtează glicina eliberată din receptorii post-sinaptici și permite degradarea acesteia de către complexul de clivare al glicinei (CCG). Receptorii glicinei sunt canale cu poartă dependente de ligand, asamblate în complexe pentamerice constând dintr-o combinație de 3 subunități α (GLRA1) și 2 subunități β (GLRB). Mutațiile GLRA1 sunt cea mai importantă cauză a hiperekplexiei (32, 34).

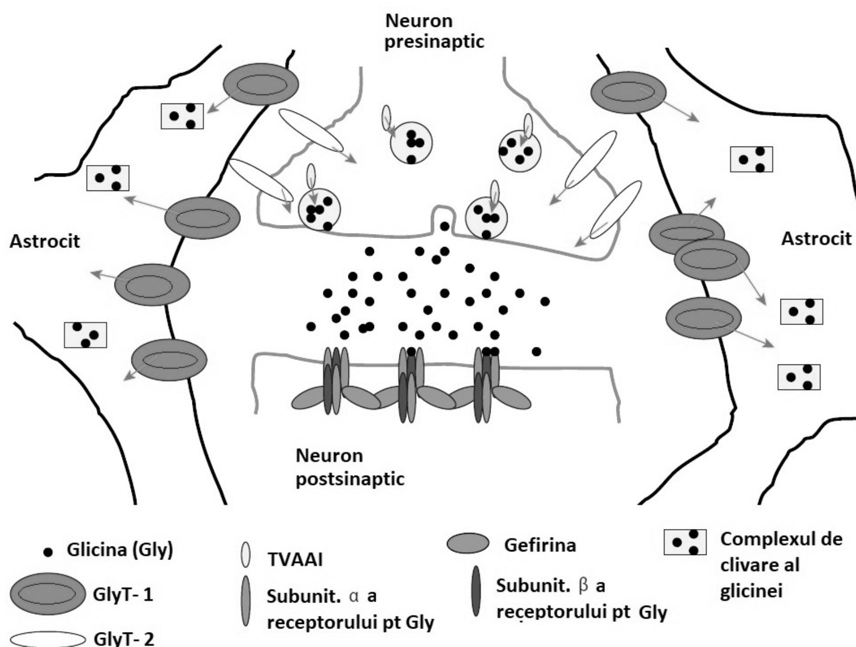


Fig. 9. Reprezentarea sinapsei glicinergice inhibitorii (schemă modif. după 34). Glicina este stocată în vezicule în neuronul presinaptic. Transportorul veziculelor de aminoacizi inhibitori (TVAAI) transportă aceste vezicule către membrana presinatică, la nivelul căreia glicina este eliberată în fanta sinaptică.

Gefirina este o proteină multifuncțională de susținere, identificată inițial prin co-purificare cu receptorul inhibitor al glicinei, este strâns co-localizată cu receptorii pentru glicină, în regiunile post-sinaptice (2, 34).

III.1.1. Hiperglicinemia noncetotică (HGN)

"Hiperglicinemia noncetotică (HGN) sau „*encefalopatia glicinică*" este o boală foarte severă, cu transmitere autosomal recesivă, şi se caracterizează prin acumularea unor mari cantităţi de Gly în toate ţesuturile organismului (inclusiv în sistemul nervos), ca urmare a deficienţei complexului de clivare al glicinei (CCG)" (116).

Posibilităţile actuale de tratament sunt orientate, pe de-o parte, spre scăderea concentraţiei glicinei din plasmă și creier, iar pe de altă parte, spre blocarea efectelor sale la nivelul receptorilor N-metil-D-aspartat (NMDA) din sistemul nervos central. Cu toate acestea, în general, terapia acestei boli este nesatisfăcătoare, iar exanguino-transfuzia, dializa, sau administrarea benzo-

atului de sodiu sunt cele care salvează viaţa nou-născutului, dar cu ventilaţie asistată, și prognosticul în această această boală rămâne sever (84, 112).

Diagnosticul biochimic al HGN (dat de defecte ale complexului de clivare al glicinei) poate fi solicitat pe baza particularităţilor clinice și necesită analiza glicinei în plasmă şi l.c.r. Raportul Gly în l.c.r./ Gly în plasmă > 0,08 (normal < 0,02) stabileşte diagnosticul. Pentru laboratoarele de genetică biochimică analiza aminoacizilor din fluidele biologice este una dintre etapele inițiale de investigație când este suspectată o boală genetică de metabolism. Astfel inițial se analizează aminoacizii din plasma și/sau urina unui pacient, și mai apoi, în funcție de tabloul clinic și rezultatele obținute se poate solicita și analiza aminoacizilor și a altor metaboliți din l.c.r., această testare impunând puncția lombară pentru colectarea l.c.r. (8, 46, 64).

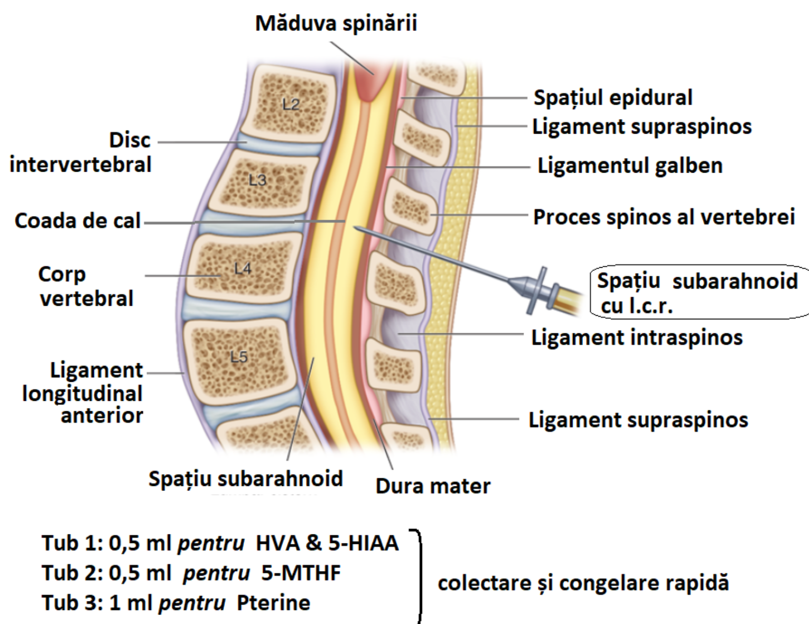


Fig. 10. Reprezentarea structurilor reper pentru puncția lombară în vederea analizei l.c.r. pentru metaboliți ai NT(schemă modificată după *www. accessmedicine, McGraw-Hill Education*); concentrația unor metaboliți este diferită într-o anumită fracțiune (conform gradientului rostro-caudal). Este importantă congelarea imediată, la -70^{o}C a probelor colectate, fără aditivi; dacă există urme de sânge, se centrifughează tubul respectiv, se congelează supernatantul, informând laboratorul asupra acestui lucru. HVA: acid homovanilic; 5-HIAA: acid 5 hidroxiindolacetic; 5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolat.

Pentru diagnostic și interpretare sunt utile valorile normale ale aminoacizilor în urina, plasma, și uneori din l.c.r.-ul, pacienților:

Tabel II. Valorile de referinţă ale aminoacizilor din lichidul cefalorahidian (μmol/l) pe categorii de vârstă (10, 116, 122):

Aminoacizi în l.c.r.	Adulți Bărbați (n = 50) Media±2SD	Adulți Femei (n = 15) Media±2SD	Copii 3-18 ani (n=58) Media±2SD	Copii sugari (<12 luni) (n=12) Media±2SD
Acid aspartic	0,4-5,2	1.4-2.2	1.9-4,2	3,1-9,9
Acid α-amino-butiric	1,5-7,1	<7,9	0,2-4,8	1,6-4,3
Alanina	13,4-48,2	11,5-41,1	11,1-29,6	16,5-36,6
Arginina	13,1-35,1	14-34,4	11,3-29,5	10,1-29,9
Asparagina	<17,9	0,6-17,4	2,7-7,4	3,5-14,5
Citrulina	0,8-4,8	<6,4	0,9-2,4	<8,5
Fenilalanina	6,7-18,3	2,4-19,2	0,5-15,9	0,6-22,6
Glicina	2,2-14,2	0,7-14,7	2,9-7,9	3,7-7,6 < 1 lună: 5-20 > 1 lună: 3-12
Glutamina	356-680	284-566	352-680	390-824
Histidina	11,4-22,2	12-25,2	8-18,4	8,3-28,5
Izoleucina	3,4-13,4	<11,1	2,2-6,2	3,9-11,3
Leucina	10,4-26,8	4,2-18,2	5,4-15,4	12,1-19,3
Lizina	20,1-42,9	15,1-36,3	9,1-25,5	9,1-33,6
Metionina	<9,3	<8,8	0,9-3,5	0,7-6
Ornitina	3-9	1,7-8,1	2-5,9	0,7-15,7
Serina	18,7-37,5	22,6-37,8	19,8-42,0	27,3-76,6
Taurina	4,4-12,4	2,5-8,5	3,7-8,6	4,2-13,3
Tirozina	5,3-13,3	1,9-13,9	4,3-11,7	6,7-20,4
Treonina	22,2-52,6	22.3-47,1	10,3-39,5	<100,6
Valina	10,1-37,7	4,5-24,5	7,6-18	9,7-28,7

Tabel III. Valorile de referinţă ale aminoacizilor din plasmă (μmol/l) pe categorii de vârstă (10, 116, 122):

Aminoacizi în plasmă	Adulți bărbați (n=50)	Adulți femei (n=15)	Adoles-cenți (n=80)	Copii (n=52)	Sugari < 3 luni (n=17)
Taurina	27-95	18-66	2-90	20-120	10-167
Acid aspartic	2 - 9	3 - 6	3 - 15	1 - 17	0-31
Treonina	92 – 180	93 - 197	102 - 246	40 - 204	46-222

Aminoacizi în plasmă	Adulți bărbați (n=50)	Adulți femei (n=15)	Adoles-cenți (n=80)	Copii (n=52)	Sugari < 3 luni (n=17)
Serina	89 – 165	78 - 166	92 - 196	70 - 194	92-178
Asparagina	32 - 92	26 - 74	34 - 94	15 - 83	38-121
Acidul glutamic	6 – 62	6 - 38	17 - 69	14 - 78	8-179
Glutamina	466 - 798	340 - 696	457 - 857	475 - 746	475-746
Prolina	97 – 297	112 - 220	58 – 324	40 - 350	97-420
Glicina	147 - 299	100 - 384	166 - 330	107 - 343	154-338 <1 lună: 230-450; >1 lună: 100-350
Alanina	146 - 494	218 - 474	242 - 594	148 - 475	274-384
Citrulina	19 - 47	10 - 58	19 – 52	8 – 47	8-47
Acidul α-aminobutiric	15 - 35	7 - 35	8 – 36	12 - 43	3-24
Valina	179 - 335	172 - 248	155 - 343	132 - 480	79-217
Cistina	24 – 54	31 - 49	36 - 58	23 – 68	6-43
Homocisteina totală	8-18	6-15	<15	4.7-10,3	3,3-8,3
Metionina	13 - 37	14 - 30	16-25	11 - 30	11-31
Izoleucina	46 - 90	39 - 67	34 - 106	6 - 122	12-77
Leucina	113 - 205	98 - 142	86 - 206	30 - 246	46-147
Tirozina	37 - 77	26 - 78	35 - 107	19 - 119	13-91
Fenilalanina	46 - 74	42 - 62	34 - 86	27 - 96	25-74
Ornitina	55 – 135	36 - 96	47 - 195	20 - 136	66-116
Lizina	135 - 243	119 - 203	116 - 276	85 - 218	154-246
Histidina	72 – 108	68 - 104	68 - 108	47 - 135	37-83
Triptofanul	25 - 65	17 - 53	-	12 – 69	21-75
Arginina	28 - 96	28 - 108	1 - 81	32 - 142	7-128

Tabel IV. Valorile de referință ale aminoacizilor din urină (μmol/l) pe categorii de vârstă (10, 116):

Aminoacizi în urină	0 – 1 luni	1 – 6 luni	6 – 12 luni	1 – 2 Ani	2 – 4 ani	4 – 7 ani	7 – 13 ani	Vârsta > 13 ani şi adulți
Taurina	8-226	6-89	9-123	12-159	13-200	17-230	18-230	16-180
Acidul aspartic	2-12	2-16	3-12	3-10	2-8	2-8	1-10	2-7
Hidroxi-prolina	20-320	0-143	0-22	0-13	0-13	0-13	0-13	0-13

Aminoacizi în urină	0 – 1 luni	1 – 6 luni	6 – 12 luni	1 – 2 Ani	2 – 4 ani	4 – 7 ani	7 – 13 ani	Vârsta > 13 ani şi adulți
Treonina	20-38	17-92	14-56	15-62	10-48	9-36	8-28	7-29
Serina	80-82	42-194	50-137	45-124	32-94	38-93	23-69	21-50
Asparagina	0-4	0-58	0-36	0-32	0-30	0-29	0-24	0-23
Acid glutamic	0-30	2-29	0-18	0-11	0-10	0-8	0-9	0-12
Glutamina	52-205	52-205	74-197	62-165	45-236	52-133	20-112	20-76
Prolina	21-213	0-130	0-14	0-13	0-9	0-9	0-9	0-9
Glicina	283-1097	210-743	114-445	110-356	111-326	91-246	64-236	43-173
Alanina	75-244	72-206	36-162	41-130	33-115	27-92	17-65	16-68
Citrulina	0,2-11	0,2-11	0-8	0-7	0-6	0-5	0-5	0-4
Acidul α-aminobutiric	0-9	0-7	0-8	0-8	0-6	0-5	0-5	0-4
Valina	3-26	4-19	6-19	7-21	6-20	3-15	3-17	3-13
Cistina	12-39	7-24	6-15	5-13	4-15	4-11	4-12	3-17
Metionina	7-27	6-22	8-29	7-29	5-21	5-20	3-17	2-16
Izoleucina	0-6	0-5	0-6	0-6	0-5	0-5	0-6	0-4
Leucina	3-25	4-12	4-16	6-17	4-18	3-13	3-16	2-11
Tirozina	6-55	12-52	11-54	13-48	10-30	9-35	6-26	2-23
Fenilalanina	4-32	7-28	11-28	10-31	7-21	6-26	5-20	2-19
Acidul α-amino-izobutiric	0-87	0-216	0-226	0-206	0-175	0-59	0-85	0-91
Ornitina	0,2-26	0,2-26	0-8	0-8	0-7	0-7	0-6	0-5
Lizina	15-199	15-199	13-79	16-69	10-46	10-68	10-56	7-58
Histidina	80-295	72-342	92-278	87-287	68-255	61-216	43-184	26-153
3-metil-histidina	20-39	19-40	20-47	22-57	20-59	21-61	18-59	19-47
Arginina	0,2-14	0,2-14	0-11	0-8	0-9	0-7	0-6	0-5

III.1.2. Hiperekplexia ereditară

Hiperekplexia ereditară numită și *boala "tresăririi"*, se referă la o reacție exagerată a pacienților cu acest defect la un zgomot brusc apărut. S-au descris manifestări tipice apărute la scurt timp după naștere, cu reacții hipertonice la zgomot și atingere. S-a arătat că în formele severe de hiperekplexie, cu debut neonatal stimuli acustici conduc la apariţia unui reflex de tresărire exagerat, urmat de un spasm tonic (*sindromul de "copil înţepenit"*) susţinut similar unui tremor. Somnul poate reduce sau chiar elimina rigiditatea și sacadele. S-au descris și cazuri cu apnee şi, uneori, acestea au determinat chiar moartea infantilă subită (sindromului morţii infantile subite sau *Sudden Infant Death Syndrome - SIDS*) explicat prin laringospasmul și insuficiența cardiorespiratorie. Din punct de vedere etimologic, origineaa numelui acestei boli vine din limba greacă, *hiperekplexia* sugerând manifestarea de tip *„surprindere exagerată"*. Boala a fost descrisă prima oară în 1958, iar în anul 1962, medicii Kok şi Bruyn au descris o boală cu caracter ereditar manifestată iniţial prin hipertonie la nou-născuţi, iar mai târziu, pentru unele cazuri, s-a incriminat această boală ca fiind răspunzătoare de decesul subit (tot la vîrsta de copil). Astăzi, se ştie că hiperekplexia este o boală genetică rară, caracterizată din punct de vedere clinic prin hipertonie neonatală şi exagerarea reflexului de tresărire. Urmărirea în timp a acestor pacienţi a arătat că s-a înregistrat o hipertonie musculară în cursul copilăriei şi o creştere tranzitorie a tonusului muscular după episoadele de tresărire; în unele familii boala este asociată cu parapareză spastică. Achizițiile motorii sunt adesea întârziate, iar dezvoltarea intelectuală este de obicei normală. S-a arătat că testele biochimice de dozare a unor metaboliți de neurotransmițători în sânge și l.c.r. sunt în general negative, și deci, diagnosticul trebuie să țină cont de tabloul clinic, de anumite particularități electrofiziologice și, atunci când sunt disponibile, de testele de genetică moleculară (34, 66, 116).

Prin urmare, diagnosticul clinic de hiperekplexie trebuie considerat atunci când sunt observate la copii următoarele semne (34, 44):

- Rigiditate generalizată imediat după naștere, semn care se normalizează în cursul primilor ani de viață, dar crește cu manipularea copilului și dispare în cursul somnului;
- Reflex de tresărire excesiv la stimuli neașteptați; se observă încă din primele zile de viață, iar la copiii mai mari determină căderi;
- Dipă reflexul de tresărire, urmează o perioadă scurtă de rigiditate generalizată (în curul căreia mișcările voluntare nu se pot realiza);
- Asocieri ale altor semne: reflex exagerat de retragere a capului provocat de percuția vârfului nasului;

- Mișcări ritmice ale membrelor în cursul somnului;
- Alte simptome asociate includ:
  - hernii inghinale, ombilicale sau epigastrice
  - displazie congenitală de șold
  - epilepsie
  - episoade de rigiditate musculară
  - apnee
  - pneumonie de aspiraţie.

Mai târziu în cursul vieţii, reperul în diagnostic poate fi doar prezenţa unui episod caracteristic care asociază tresărire, lăsarea braţelor lateral şi cădere neprotejată care urmează unor stimuli brutali. În aceste situaţii, cunoștința pacientului este păstrată (cu excepția situaţiilor în care exisă traumatisme cranio-cerebrale) şi de obicei, nu există modificări ale traseelor EEG. S–a demonstrat originea genetică a acestei anomalii (fie prin mecanism autosomal recesiv, fie prin mecanism autosomal dominant), iar analizele de genetică moleculară au arătat că cea mai mare parte dintre cazurile de hiperekplexie sunt cauzate de mutaţii în subunitatea α_1 a receptorului glicinei (gena GLRA1) (34). Majoritatea studiilor de proteomică legate de etiopatogenia acestei boli erau orientate spre studiul proteinelor din neuronii *postsinaptici*, ulterior însă, s-a arătat că există o serie de mecanisme care sunt legate de terminaţiile *presinaptice* implicate în acestă boală, precum şi defecte de la nivelul celulelor gliale. Astfel, s-a precizat că diagnosticul molecular actual trebuie să ţină cont de posibilitatea identificării unor mutaţii în gene care codifică atât proteine postsinaptice, cât şi în gene ale proteinelor localizate în neuronul presinaptic sau de la nivelul celulelor gliale. Componentele studiate în sinapsele inhibitorii au permis stabilirea următoarelor caracteristici (21, 33, 34, 40, 53):

1. S-au identificat mai mulți pacienţi cu mutaţii afectând receptorul glicinei, mutaţii în gena GLRA1 (corespunzătoare subunităţilor $\alpha 1$ şi respectiv în gena GLR - care codifică receptorul β localizat în membrana neuronului postsinaptic; există studii care au arătat că disfuncţii ale subunităţii α_1 ale acestui receptor (în special identificate la pacienţi cu hiperekplexie) sunt corelate cu mutaţii în gena unui canal de clor care aparţine canalelor dependente de ligand. Astfel, s-au identificat câteva proteine implicate în asamblarea şi/sau stabilizarea componentelor receptorului glicinei sau care intervin în transportul glicinei spre veziculele de stocare sau în procesul de recaptare a acestui aminoacid din fanta sinaptică. Semnificaţia patogenetică a acestor proteine s-a studiat prin teste de inducere a mutaţiilor în genele care le codifică, urmărindu-se efectele inactivării secvenţelor genice de interes. Ca elemente din citoschelet implicate în procesul normal care implică acești receptori, s-a arătat că ***gefirina***

are un rol important în menţinerea grupată a subunităţilor α1 şi β ale receptorului glicinei, iar ***colibistina (RhoGEF)*** ar asigura translocarea gefirinei la nivelul sinapsei GABA-ergice; deficitul experimental de ***RhoGEF*** (respectiv la animalele *Knock Out* pentru această proteină) nu se soldează cu răspuns exagerat la stimuli acustici sau tactili, așa cum s-a înregistrat în cazul animalelor la care s-a alterat exăresia genică pentru gefirină.

2. Îndepărtarea glicinei ajunse în fanta sinaptică s-ar face cu ajutorul t***ransportorului GlyT1*** (aflat în membrana celulelor gliale din jurul spaţiului sinaptic) și ar avea rolul de a participa astfel la stoparea neurotransmiterii şi probabil la incorporarea glicinei în vezicule. În studiile pe animale de laborator care au indus deficitul experimental al transportorului GlyT1 s-a identificat creşterea concentraţiei glicinei în l.c.r. şi în ser, iar animalele dezvoltă manifestări şi leziuni de tipul celor notate în encefalopatia glicinică (HGN).

3. Recaptarea glicinei din spaţiul sinaptic se face prin participarea t**ransportorului *GlyT2*** situat în membrana neuronului presinaptic, transportor responsabil de recuperarea acestui aminoacid în neuronului presinaptic. În mod normal acesta va transmite glicina spre o veziculă care poartă în membrana sa transportorul vezicular (Transportorul vezicular al aminoacizilor cu rol inhibitor, TVAAI) şi care asigură apoi reumplerea cu glicină a veziculelor din terminaţia presinaptică. Pe de altă parte, glicina este sintetizată din serină prin intervenţia serin hidroximetil transferazei (SHMT). Mutaţiile induse (la animale de tip *Knock Out*) pentru crearea disfuncţiei GlyT2 determină apariţia modificărilor tipice hiperekplexiei de la om (rigiditate, tonus muscular crescut, spasticitate, tremur).

Tratamentul simptomatic la adulți se face cu clonazepam (1 mg pe zi). La copii sunt necesare doze mai mici, iar Vigabatrin-ul este ineficient. Copiii beneficiază de încercări repetate de exerciții fizice, mai degrabă decât de proceduri de fizioterapie. Activitățile extinse pe teren moale sau nisipos sunt deosebit de eficiente, și frcvent poate fi necesară intervenția psihologică. Clonazepamul rămâne tratamentul pentru toate vârstele, fără a se cunoaște complet mecanismul de acțiune, dar s-o constatat că acest medicament se atașază la nivelul site-ului benzodiazepinic al receptorul $GABA_A$ (34, 44, 52).

III.2. Defecte în metabolismul serinei

Anomaliile genetice legate de deficienţa serinei constituie un grup de boli neurometabolice şi sunt cauzate de defecte din biosinteza aminoacidului L-serina. Spre deosebire de majoritatea bolilor neurometabolice, anomaliile genetice legate de deficienţa serinei sunt potenţial tratabile (23, 24, 25, 54).

Câteva caracteristici biochimice privind acest aminoacid cu rol în neurotransmitere, a cărui metabolism este legat de glicină:

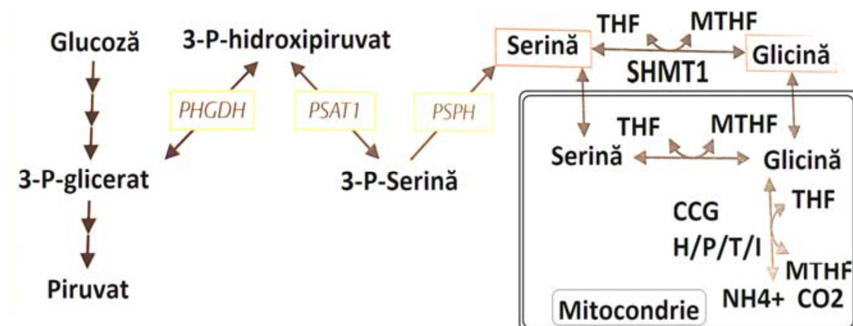


Fig.11. Reprezentarea metabolismului serinei și glicinei (modif. după 78, 123); PHGDH: 3-P glicerat dehidrogenaza; PSAT1: 3-fosfoserinamino transferaz; PSPH: 3-fosfoserin fosfataza; THF: tetrahidrofolat; MTHF: metilentetrahidrofolat; CCG (H/P/T/I): complexul de clivare al glicinei.

"Mult timp s-a apreciat că D-aminoacizii se găsesc doar în insecte și în anumite organisme bacteriene, dar studiile mai recente au demonstrat prezenţa D-serinei în concentraţii foarte mari în creierul mamiferelor şi în concentraţii mult mai mici în țesuturi periferice. D-serina din creier corespunde unei concentraţii de cca o 1/3 din nivelul plasmatic al L-serinei; spre deosebire de L-aminoacizi, D-serina nefiind incorporată în proteine sau peptide, constituie o rezervă importantă în totalul aminoacizilor liberi. Hashimoto şi colab. (1993) au fost primii care au observat la şobolanii de laborator că există o concentraţie mare de D-serină în regiuni ale prozencefalului în care sunt abundenţi receptorii NMDA. Studii ulterioare bazate pe tehnici imunohistochimice au demonstrat că distribuţia regională a D-serinei co-localizează aproape perfect cu regiunile în care sunt identificaţi receptorii NMDA. În schimb, concentraţia D-serinei este mai scăzută în partea caudală a creierului (inclusiv în trunchiul cerebral şi cerebel). În ultimii ani s-a arătat că D-serina este un co-agonist fiziologic al receptorilor glutamatului de tip NMDA (N-metil D-aspartat), un receptor „cheie" al căilor excitatorii din creier. Receptorii NMDA sunt componente esenţiale ale căilor excitatorii mediate de NT la nivelul creierului şi sunt implicaţi într-o serie de procese fiziologice cum sunt: formarea memoriei, plasticitatea sinaptică şi dezvoltarea cerebrală. Aceşti receptori cuprind mai multe subunităţi şi activităţile lor sunt controlate prin mecanisme cum sunt legarea liganzilor şi interacţiunea cu anumite proteine. Receptorii NMDA au o permeabilitate mare pentru ionii de calciu despre care se ştie că joacă un rol

esenţial în plasticitatea sinaptică şi în realizarea mecanismelor de transmitere a numeroaselor semnale la nivelul neuronilor. Totuși, suprastimularea receptorilor NMDA provoacă neurotoxicitate şi este implicată în condiţii patologice cum sunt AVC-urile (accidentele vasculare cerebrale) şi bolile neurodegenerative. Cercetări recente au arătat că glutamatul, principalul agonist al receptorilor NMDA, nu activează aceşti receptori decât în prezenţa unor co-agonişti prezenţi pe una dintre subunitățile NMDA; s-a constatat că D-serina este un co-agonist esenţial (care se leagă în poziţia glicinei de la nivelul NMDA) al acestor tipuri de receptori (conferind rol de neuromodulator); prin această acţiune mediind procese precum creşterea afinităţii receptorului pentru glutamat, stimularea *turnover*-ului NMDA prin internalizare" (sinteză în 116):

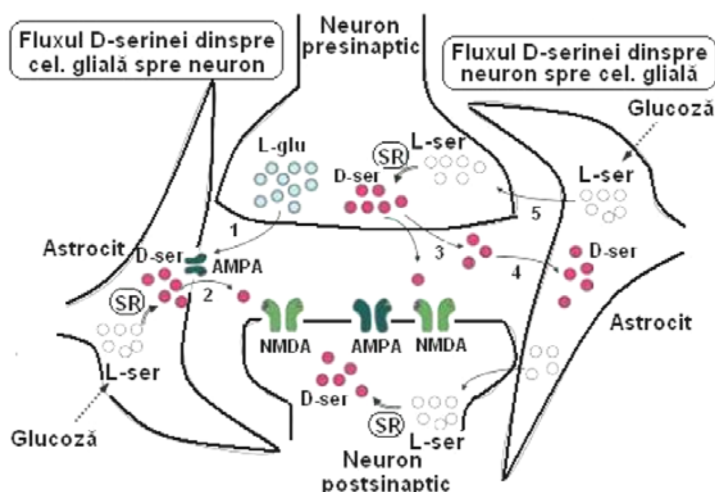


Fig. 12. Schema implicării D-serinei (D-ser) în semnalizarea sinaptică de la nivelul neuronilor şi a celulelor gliale; se prezintă două modele pentru eliberarea D-serinei (schemă modif. după date din literatură, preluată din vol. Aminoacidopatii, aspecte genetice, biochimice și clinice, R. Vulturar, M. Cucuianu (116)).

Mecanismele reprezentate în imagine pot fi sumarizate astfel (116):

a. "Fluxul D-serinei ***dinspre celulele gliale spre neuroni*** este realizat prin activarea receptorilor gliali AMPA din astrocite de glutamat (L-glu) provenit din neuronul presinaptic (reacţia 1); aceasta duce la eliberarea D-serinei din astrocit şi activarea receptorilor NMDA neuronali (reacţia 2). Deoarece enzima *serin racemaza* (SR) se găseşte predominant în neuroni, astrocitele pot obţine D-serina prin recaptarea din mediul extracelular. În mod alternativ, anumite astrocite (care dispun de *serin racemază*) au capacitatea de a sintetiza D-serina după obţinerea L-serinei din glucoză.

b. Fluxul D-serinei ***dinspre neuroni spre celulele gliale*** ar fi realizat prin eliberarea D-serinei din neuroni, mai probabil prin depolarizare (reacția 3). Eliberarea D-serinei va activa receptorii NMDA din neuronul presinaptic sau va fi preluată în astrocite (reacţia 4). Deoarece neuronii sunt în cea mai mare parte lipsiţi de capacitatea de a sintetiza L-serina din glucoză, se presupune că aceştia preiau L-serina care provine din astrocite (reacţia 5). *Studiile actuale nu au permis încă elucidarea tipurilor de neuroni (pre sau postsinaptici) în care se sintetizează, respectiv din care se eliberează D-serina*" (116).

III.3. Defecte în metabolismul pterinelor şi aminelor biogene

Sistemul de neurotransmiţători aminergic cuprinde aminele biogene sintetizate din tirozină şi cunoscute cu numele de catecolamine (noradrenalina, adrenalina, dopamina) fiindcă în formula lor se regăseşte structura numită *catecol* (formată dintr-un inel fenolic cu două grupări hidroxil). În plus, în clasa aminelor biogene este inclusă şi serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) care, din punct de vedere structural, este o indolamină care provine din triptofan (28, 44).

Tabel V. Aminele biogene formate din aminoacizi

(modif. după 63, preluat din 116):

Aminoacidul corespunzător	Funcţie, sinteza unor molecule	Amina rezultată
Serina	Serina facilitează efectul excitator al glutamatului, etanolamina intră în constituţia cefalinelor	Etanolamina
Cisteina	Componentă a Coenzimei A	Cisteamina
Treonina	Componentă a vitaminei B_{12}	Propanolamina
Acidul aspartic	Componentă a vitaminei B_5 (acidul pantotenic)	β-alanina
Acidul glutamic	Neurotransmiţătorul GABA	γ-aminobutirat
Histidina	Mediator, neurotransmiţător	Histamina
Dopa	Neurotransmiţător	Dopamina
5-hidroxitriptofan	Mediator, neurotransmiţător	Serotonina

Deficienţele genetice din metabolismul monoaminelor sunt boli în care se pot observa manifestări clince care aparţin unui spectru larg, fiind marcate însă de disfuncţii motorii (distonie, parkinsonism), retard în dezvoltare cu caracter progresiv, encefalopatie epileptică (13, 43, 45, 90).

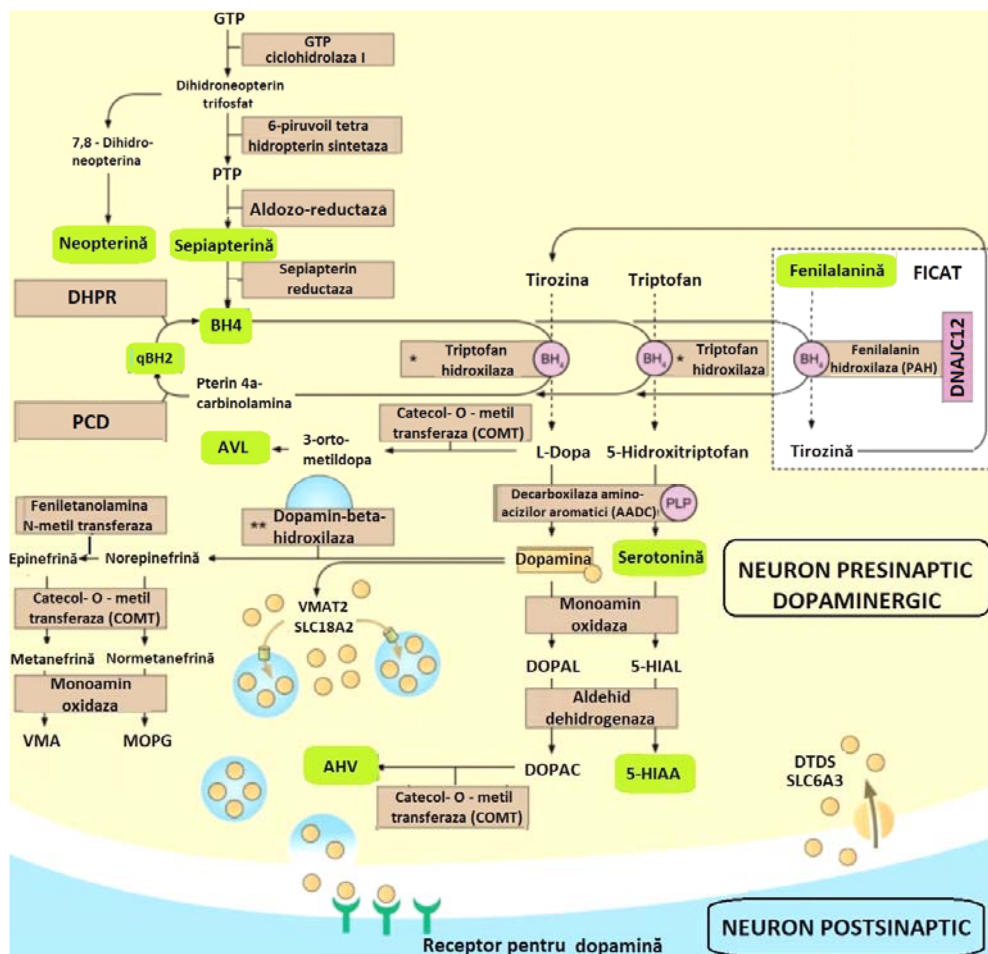


Fig. 13. Căi de sinteză, degradare și reciclare a neurotransmițătorilor și biopterinei, reacții identificate în neuronii dopaminergici, schemă modificată după Brennenstuhl și colab., 2019 (13)

Legendă
Enzimă
Metaboliți imp. pt. diagnostic
Cofactori
Dopamina VMAT2

5-HIAA: acid 5-hidroxiindoleacetic;
5-HIAL: 5-hidroxiindoleacetaldehidă;
BH_4: tetrahidrobiopterină;
DHPR: dihidropterin reductaza;
DOPAC: acid 3,4-dihidroxifenilacetic;
DOPAL: 3,4-dihidroxifenilacetaldehidă;
DTDS: sindromul deficitului de transport al dopaminei;
GTP: guanozin-5'-trifosfat;
AHV: acid homovanilic;
MOPG: metoxilhidroxifenilglicol
PCD: PCD - Pterin-4α-carbinolamin-de-hidrataza
PLP: piridoxal 5'-fosfat;
PTP: 6-piruvoltetrahidropterină;
qBH_2: dihidrobiopterină chinonoidă;
VLA: acid vanililactic;
VMA: acid vanililmandelic;
VMAT 2: transportor vezicular de monoamine.
NE; norepinefrină (noradrenalină);
*S-a arătat că interacționează cu DNAJC12
**Localizare intra-veziculară, la nivelul membranaei

Aceste boli sunt uneori recunoscute prin identificarea unei hiperfenil-alaninemii, iar diagnosticul precoce prin analiza metaboliţilor monoaminici şi pterinelor în l.c.r., este foarte important, unele defecte încadrându-se în clasa bolilor genetice tratabile (9, 72, 111).

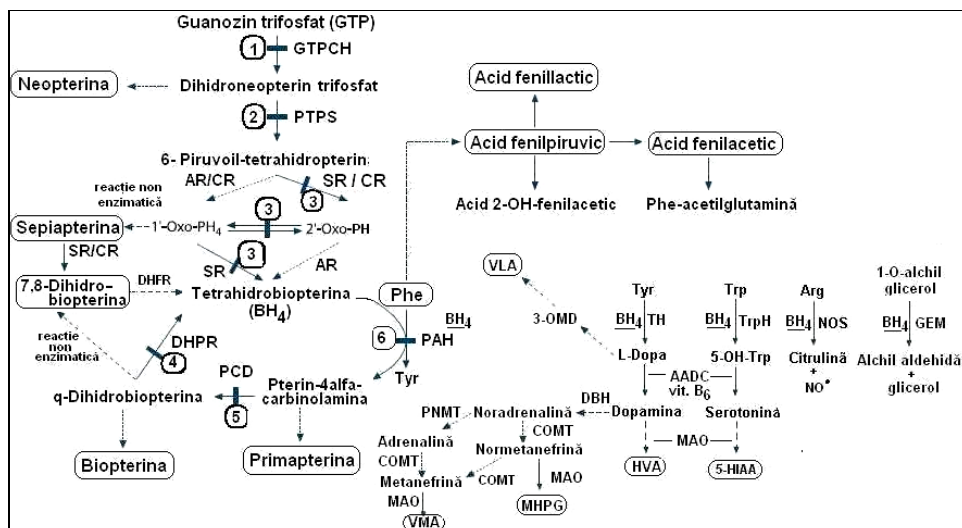


Fig. 14. Reprezentarea schematică a sintezei, regenerării tetrahidrobiopterinei (BH_4), precum şi a cuplării metabolismului acestuia cu procesul de hidroxilare a aminoacizilor aromatici şi formarea dopaminei şi serotoninei [modif. după date din literatură (10, 61), preluată din 116].

1- PAH - Fenilalaninhidroxilaza	CR - Carbonil reductaza
2- GTPCH – Guanozintrifosfat ciclohidrolaza I	AADC - Decarboxilaza L-aminoacizilor aromatici
3- PTPS – 6-piruvoil-tetrahidropterin sintetaza	DBH- dopamin β hidroxilaza
4- DHPR – Dihidropteridinreductaza	5-HIAA - Acidul 5-hidroxiindolacetic,
5- PCD - Pterin-4α-carbinolamin-dehidrataza	NOS - Sintetaza oxidului nitric,
6- SR - Sepiapterin reductaza	Noradrenalina= norepinefrina,
DHFR – Dihidrofolat reductaza	Tyr – Tirozina,
HVA - Acid homovanilic	TH/TYH - Tirozinhidroxilaza,
VMA - Acid vanilmandelic	TPH/TrpH - Triptofan hidroxilaza.
AR - Aldozo reductaza	GEM - Gliceril eter monooxigenaza
Arg – Arginina	MHPG - 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol
Cit - Citrulina	

Disponibilitatea recentă a testării genetice prin secvențierea genelor implicate în acest tip de defecte permite evaluarea neinvazivă pentru stabilirea unui diagnostic molecular (45, 123).

Din punct de vedere al analizelor de dozare a aminoacizilor în fluide biologice, defectele de sinteză sau reciclare a tetrahidrobiopterinei (BH_4) afectează metabolismul fenilalaninei, tirozinei şi triptofanului; din perspectiva examinării clinice, semnele sunt legate de manifestări implicând deficiența dopaminei şi serotoninei (10, 123).

Tabel VI. Caracteristici de expresie tisulară a unor enzime afectând metabolismul unor aminoacizi (44, 123):

Componenta afectată de defectul genetic	Distribuția tisulară	Localizarea cromoso-mială	Cod în catalogul McKusick
Deficiența tirozin hidroxilazei (TH)	Creier, rinichi	11p15.5	191290
Deficiența decarboxilazei aminoacizilor aromatici (AADC)	Creier, ficat, rinichi, neuroni periferici	7p12.1-p12.3	107930
Deficiența dopamin-β-hidroxilazei (DBH)	Creier, neuroni periferici	9q34	223360
Deficiența monoamin oxidazei A (MAO-A)	Ubiquitară	Xp11-p21	307850
Hiperekplexia, defectul receptorului glicinei	Creier	5q33-q35	149400

Testele diagnostice (cu posibilitatea identificării unor boli severe care beneficiază de terapie cum este DRD- Distonia cu răspuns pozitiv la administrarea de L-dopa) necesită fie teste moleculare, fie analiza aminelor biogene, pterinelor şi aminoacizilor în l.c.r., a aminoacizilor plasmatici, precum şi a pterinelor urinare. Terapia acestor deficienţe se face cu L-Dopa (asociată cu carbidopa), 5-hidroxitriptofan şi/sau agonişti a dopaminei (45, 123).

De asemenea, o altă deficiență tratabilă este cea legată de dopamin beta-hidroxilaza (DBH). Sunt binecunoscute caracteristicile acestei enzime care este dependentă de cupru și care transformă dopamina în norepinefrină în neuronii noradrenergici. Deficitul de DBH se prezintă prin debut în perioada infantilă prin insuficiență noradrenergică cu hipotensiune ortostatică. Pacienții cu acest defect (transmis autosomal recesiv) pot prezenta vărsături episodice, deshidratare, hipotermie, hipoglicemie. Există adesea intoleranță la efort. Dozările nivelurilor de norepinefrină și epinefrină din plasmă arată valori reduse sau absente ale acestor compuși, în timp ce nivelurile plasmatice de dopamină sunt crescute de cca 5-6 ori. Analiza l.c.r. demonstrează creșterea acidului homovanilic (HVA), reducerea metabolitului 3-metoxi-4-hidroxi-feniletilenglicol (3-MHPG). Dozările de 5-HIAA și 3-O-metildopa arată valori normale. Tratamentul se face cu L-threo-3,4-dihidroxifenilserina (droxidopa sau L-DOPS) care este un aminoacid sintetic și precursor al norepinefrinei și epinefrinei, și care poate traversa bariera hematoencefalică și ameliorează hipotensiunea ortostatică, și celelalte simptome (44, 93).

III.4. Defecte legate de transportul aminelor biogene

a) Mutațiile în gena transportorului de dopamină (SLC6A3 sau DTDS) au fost descrise recent. Pacienții au prezentat la vârsta de copil mic anomalii de tipul mișcărilor mixte (de tip hiperkinetic și hipokinetic – parkinsonism), hipotonie axială, semne piramidale, disfuncții vegetative și anomalii oculomotorii. Dezvoltarea este întârziată la nivel global. Tabloul clinic nu include microcefalie, epilepsie, iar rezonanță magnetică structurală (RMN-ul) este normală, sau identifică atrofie cerebrală minoră sau modificări nespecifice ale substanței albe. Testarea în l.c.r. a neurotransmițătorilor a demonstrat un raport crescut HVA:HIAA (ajungând până la valori de 5-13, valorile normale ale acestui raport fiind de cca 1.3-4). De asemenea, acidul homovanilic urinar (HVA ur), respectiv prolactina serică vor avea valori crescute. Transmiterea este autosomal recesivă, iar în ultimii ani diagnosticul

este disponibil și la nivel molecular. Tratamentul a fost încercat cu L-DOPA în asociere cu carbidopa și agoniști ai dopaminei, dar rezultatele au fost limitate (44, 45, 93).

b) Deficiența genetică descrisă în gena transportorului (VMAT2 codificat de gena notată SLC18A2) a fost descris în populația saudită, și afectează o proteină din membrana presinaptică care este implicată în transportul monoaminele în veziculele sinaptice. Pacienți prezintă disfuncții vegetative și anomalii oculomotorii, retard în dezvoltare și anomalii ale somnului. Examinările imagistice de tip RMN, respectiv analiza l.c.r. pentru studiul neurotransmițătorilor au fost normale, ceea ce este foarte particular în comparație cu toate celelalte anomalii ale aminelor biogene. Diagnosticul acestei boli autosomal recesive este confirmat prin eliminări urinare crescute ale 5-HIAA și HVA, alături de scăderea norepinefrinei și dopaminei urinare. Tratamentul cu agoniști ai dopaminei îmbunătățește simptomele motorii și, într-o măsură mai mică, retardul cognitiv (44, 7, 93).

Tabel VII. Caracteristicile comparative a mecanismelor deficitare a transmiterii genetice cu încadrarea OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*), precum și abordarea generală terapeutică a acestor defecte monogenice din metabolismul biopterinei, aminelor biogene (13, 61, 123):

Tipul defectului molecular	**Deficiența genetică a proteinei**	**Codul OMIM**	**Modul de transm.**	**Medicația recomandată**
Defect de tip co-chaperonă	DNAJC12	606060	AR	**BH_4**: doze conform valorilor Phe din sânge; **L-Dopa** în combinație cu **Carbidopa** în raport 4:1. **5-HTP** titrare conform val. Phe plasmatice.
Defecte de sinteză/ reciclare BH_4	SR	612716	AR	**L-Dopa** în combinație cu **Carbidopa** în raport 4:1. **5-HTP** titrare conform val. Phe plasmatice.
	GTP-CH (formă AD)	233910	AD	**L-Dopa** în combinație cu **Carbidopa** în raport 4:1.

Tipul defectului molecular	Deficiența genetică a proteinei	Codul OMIM	Modul de transm.	Medicația recomandată
	GTP-CH (formă AR)	233910	AR	**L-Dopa** în combinație cu **Carbidopa** în raport 4:1. **5-HTP** titrare conform val. Phe plasmatice.
	PTPS	261640	AR	**L-Dopa** în combinație cu **Carbidopa** în raport 4:1. **5-HTP** titrare conform - val. Phe plasmatice.
	DHPR	261630	AR	**L-Dopa , 5-HTP**, nivelul Phe controlată doar prin dietă restrictivă, **acid folinic.**
	PCD	264070	AR	**BH_4**: doze conform valorilor Phe din sânge; testare pt. diabet.
Defecte primare de sinteză a NT	TH	605407	AR	**L-Dopa** în combinație cu **Carbidopa** în raport 4:1.
	AADC	608643	AR	**Agoniști de dopamină (pramipexole, ropinirole, rotigotine, bromocriptină), Inhibitori de MAO** Cofactori: **piridoxină, piridoxal fosfat**
Defecte ale unor trans-portori de monoamine	SLC6A3 (DTDS)	613135	AR	**Agoniști de dopamină** (de tip ***pramipexol, ropinirole, rotigotine***)
	SLC18A2 (VMAT2)	352649	AR	**Pramipexole**
Defecte de catabolism al mono-aminelor	MAO-A/ MAO-B	309850	X-linkat	**SSRI** – efecte benefice la șoareci, date indisponibile încă pt. adm. La om
	DBH	609312	AR	**Droxidopa** – efecte bene-fice pentru adm. la adulți, fără date dispo-nibile pt. adm. la copii.

Legendă: 5-HTP: 5-hidroxitriptofan; AADC: decarboxilaza aminoacizilor L-aromatci; AD: autosomal dominant; AR: autosomal recesiv; BH_4: tetrahidrobiopterină; DBH: dopamin β-hidroxilaza; DHPR: dihidropterin reductaza; DTDS: sindromul deficienței transportotului dopaminei; GTP-CH: guanozin-5′-trifosfat ciclohidrolaza; MAO-A/B: monoamin oxidaza A/B; PCD- pterin 4a-carbinolamin dehidrataza; PTPS: 6-piruvoiltetrahidropterin sintetaza; SR: sepiapterin reductaza; SSRI: inhibitori selectivi ai recaptării serotoninei; TH: tirozin hidroxilaza; VMAT2: transportorul vezicular monoaminic 2.

Tabel VIII. Condiţii de recoltare şi păstrare a probelor biologice utile în diagnosticul defectelor din metabolismul monoaminelor (9, 47-49, 116, 123):

Metabolitul investigat	Condiţii necesare înainte de recoltarea probelor biologice	Proba biologică	Condiţii de păstrare	Teste fals pozitive
Phe	Dietă liberă (fără restricţii alimentare)	Hârtia de tip Guthrie, analiza în plasmă, ser (sau l.c.r.)	Congelare (la -20°C)	
Neopterina	Dietă liberă (fără restricţii alimentare); dozarea Neo dacă Phe este crescută în plasmă	Urină recoltată spontan, fără colectare pe 24h	Congelare (la -20°C), probe ferite de lumină, oxidate cu MnO_2 la pH:1-2;	În infecţii creşte conc. neopterinei
Biopterina	Dietă liberă (fără restricţii alimentare); dozarea Bio dacă Phe este crescută în plasmă	Ser/ plasmă	Congelare (la -20°C), probe ferite de lumină	
Biopterina	Dietă liberă (fără restricţii alimentare); dozarea Bio dacă Phe este crescută în plasmă	l.c.r.	Recoltare în tub cu EDTA, congelare (la -20°C)	
BH_4, BH_2	1 oră înainte de medicaţie, se elimină primul volum de 0,5 ml	l.c.r.	Colectare în tuburi speciale (cu DETAPAC, *acid dietilentriamin pentaacetic*), congelare (-80°C),	

Metabolitul investigat	Condiţii necesare înainte de recoltarea probelor biologice	Proba biologică	Condiţii de păstrare	Teste fals pozitive
HVA	1 oră înainte de medicaţie	l.c.r.	Tuburi cu EDTA, congelare rapidă după rec.(-80°C),	
5-HIAA	Se solicită laboratorului cerințele pentru recoltarea volumului necesar de l.c.r. conform gradientul rostro-caudal	l.c.r.	Tuburi cu EDTA, congelare (la -80°C),	
5-MTHF	Se solicită laboratorului cerințele pentru recoltarea volumului necesar de l.c.r. conform gradientul rostro-caudal	l.c.r.	Tuburi cu EDTA, congelare (la -80°C),	
DHPR		Sânge venos recoltat pe heparină (se vor separa eritrocitele)	Congelare la -20°C	
		Spoturi de sânge de pe hârtie de filtru Guthrie	Temperatura camerei	
		Fibroblaste	Temperatura camerei	
		Vilozităţi coriale (minim 50 mg)	Congelate la -80°C	
PTPS	Recoltarea probelor înainte de a se administra BH_4	Eritrocite din tuburi cu sânge recoltat pe heparină	Congelate la -20°C	
PTPS	Recoltarea probelor înainte de adm. BH_4	Vilozităţi coriale (minim 50 mg)	Congelate la -80°C	
GTP-CH	Biopsie cutanată	Fibroblaste	Temperatura camerei	
SR	Biopsie cutanată	Fibroblaste	Temperatura camerei	

Phe: fenilalanină, DHPR: dihidropteridin reductaza, HVA: acid homovanilic,
5-HIAA: Acidul 5-hidroxiindolacetic, Bio: biopterina,
5-MTHF: 5-metilentetrahidrofolat, PTPS: 6-piruvoil-tetrahidropterin sintetaza,
GTP-CH: Guanozintrifosfat ciclohidrolaza I, SR: sepiapterin reductaza.

Din punct de vedere practic, atât în specialitățile clinice, dar și pentru speciliștii implicați în testarea de laborator, este utilă reprezentarea comparativă a rezultatelor de analiză în l.c.r pentru metaboliții legați de anomaliile monoaminelor și a sintezei tetrahidrobiopterinei. Acestea vor fi utile și pentru încadrarea de diagnostice diferențiale, respectiv de încadrare a unor artefacte din cursul etapelor pre-analitice (9, 117).

Date biochimice comparative utile în diagnosticul diferențial al unor defecte genetice din metabolsimul monoaminelor și a metabolismului tetrahidro-biopterinei (9, 93):

Defectul metabolic	Niveluri identificate în l.c.r.							
	Neopterina	Sepiapterina	Biopterina	5-HTP	HVA	5-HIAA	3-OMD	MHPG
Deficiența DBH						n	↑	↓↓
Deficiența TH					↓↓	n	n	↓
Deficiența AADC				↑↑	↓↓	↓↓	↑↑↑	
Deficiența MAO-A					↓	↓	n	↓
Deficiența transportorului dopaminei					↑	n		
Deficiența transportorului VMAT2 (dopamină, serotonină)					n	n		
Deficiența GTP-CH (autosomal recesivă)	↓↓		↓↓		↓↓	↓		
Deficiența 6-PTPS	↑↑↑		↓↓↓		↓↓	↓↓		
Deficiența DHPR	n		n - ↑		↓↓	↓↓		
Deficiența PCD (numită și primapterin-urie)	↑-↑↑							
Boala Segawa (distonia cu răspuns la Dopa)	↓		↓		↓	↓ - n		
Deficiența SR	n	↑↑	↑		↓↓↓	↓↓↓		

Obs: sunt marcate cu n - valorile normale ale metaboliților din l.c.r. pentru a servi în diagnosticului diferențial.

III.5. Defecte în metabolismul acidului gama amino butiric (GABA)

Formarea acidului γ-aminobutiric (GABA) din acid glutamic este de o deosebită importanţă funcţională demonstrând că prin decarboxilarea glutamatului (un neurotransmiţător excitator) se ajunge la GABA (un mediator cu efect de inhibare). Pe de altă parte, transaminarea poate duce la transformarea acidului γ-aminobutiric în acid glutamic (9, 119) .

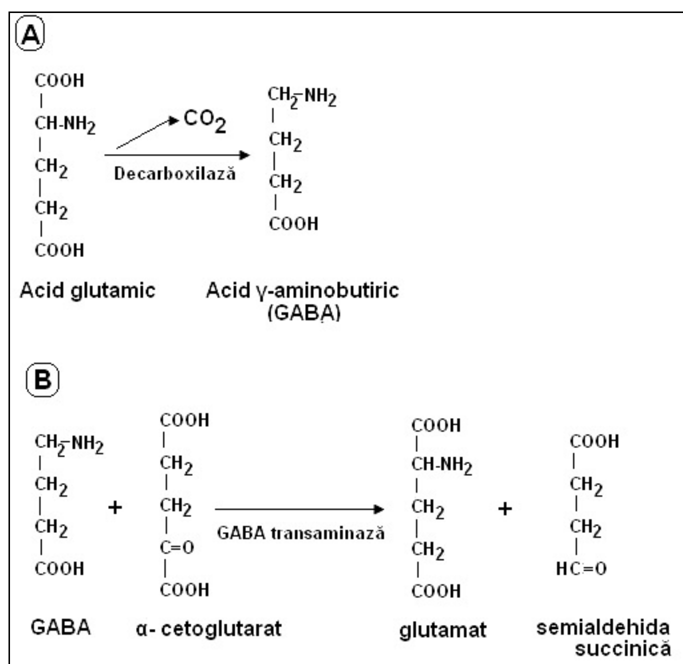


Fig. 15. Schema unor procese biochimice care modifică neurotransmiterea

(după date din literatură - 1, 107)

A. Reacția de transformarea acidului glutamic (cu efect excitator) în acid γ-amino-butiric (care are efect inhibitor).

B. Prin transferul grupării amino din GABA la acid α-cetoglutaric se formează acid glutamic (efect excitator) şi semialdehida succinică, moleculă care trecând prin etape de succinat, fumarat, malat şi oxaloacetat ajunge să formeze compusul α-cetoglutarat, iar acesta poate trece în glutamat.

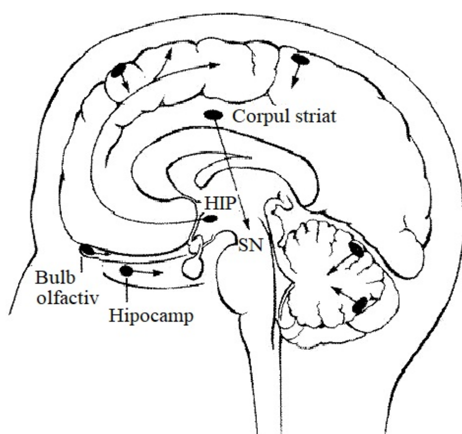


Fig. 16. Reprezentarea proiecţiilor neuronilor GABA-ergici [modif. după Grubbs 2008 (39), preluată din 116].

HIP: hipocamp,
SN: substanţa neagră (locus niger).

Anomaliile acestui NT produc disfuncţii ale sistemului nervos central marcate cel mai frecvent de encefalopatia epileptică.

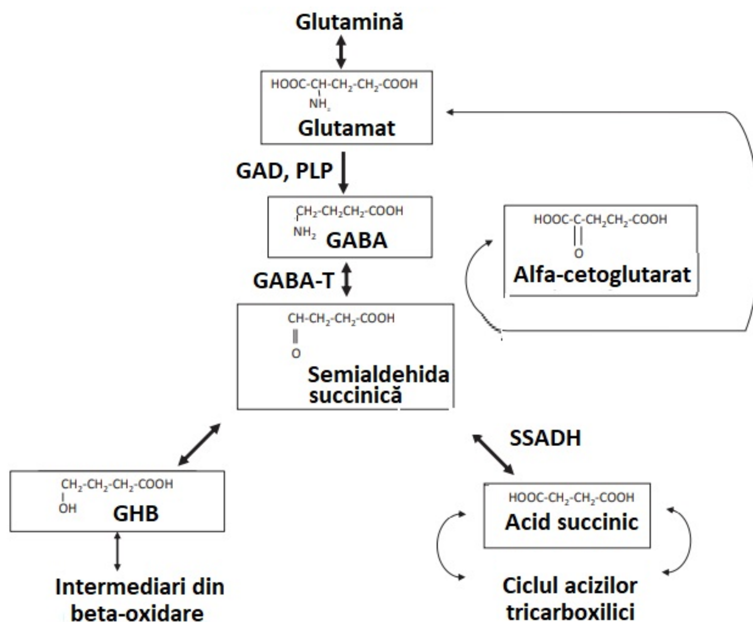


Fig. 17. Reprezentarea căilor metabolice implicate în catabolismul GABA (Acidul γ-aminobutiric). schemă modif. după Rodan, Pearl 2015 (93)

GAD: Decarboxilaza acidului glutamic,
PLP: piridoxal fosfat,
GABA-T: GABA transaminaza,
GHB: Acidul γ-hidroxibutiric;
SSADH: Dehidrogenaza semialdehidei succinice.

Diagnosticul biochimic este posibil prin analiza aminoacizilor şi a acidului GABA în l.c.r. În plus, în urina pacienţilor se pot găsi concentraţii crescute ale acidului 4-hidroxibutiric (ca marker al deficienţei dehidrogenzei semialdehidei succinice (SSADH). Din datele de literatură s-a concluzionat că majoritatea pacienţilor cu acest defect prezintă retard al dezvoltării intelectuale, afectarea limbajului, retard al dezvoltării motorii asociate cu hipotonie, hiporeflexie, crize epileptice şi ataxie nonprogresivă. În plus, s-au mai observat la unii pacienţi modificări psihice de tipul celor obsesiv-compulsive sau de tipul tulburărilor pervazive de dezvoltare. Terapia acestui defect se face prin administrarea Vigabatrinului (un inhibitor ireversibil al GABA transaminazei) (123).

III.6. Defecte în metabolismul vitaminei B_6 (piridoxal fosfat)

Piridoxal fosfatul este cofactor al tuturor reacţilor de transaminare, al unor reacţii de decarboxilare şi dezaminare a unor aminoacizi; de asemenea, vitamina B_6 este necesară biosintezei unor NT cum sunt dopamina şi GABA. Deficienţa intracelulară poate fi datorată unor cauze primare sau secundare de biosinteză a acestui cofactor, şi duce la encefalopatie epileptică încă din perioada de nou-născut (102, 123). ”Deşi *epilepsia dependentă de piridoxină* a fost iniţial considerată o anomalie legată de sinteza GABA, datorită rolului de cofactor al piridoxal fosfatului pentru decarboxilaza acidului glutamic, datele recente au sugerat că ar fi implicate alte căi metabolice în această boală “(116).

Investigaţiile postmortem ale acestor pacienţi (bazate pe cuantificarea concentraţiei GABA şi glutamatului), precum şi analizele de genotipare nu au demonstrat existenţa unei sinteze insuficinte a GABA sau o modificare genetică răspunzătoare de disfuncţia decarboxilazei acidului glutamic. Din punct de vedere clinic, *epilepsia dependentă de piridoxină* este suspectată la nou-născuţii cu crize epileptice refractare la tratamentul cu antiepileptice uzuale (uneori cu posibil debut al epilepsiei chiar prenatal) şi pentru care înregistrările EEG arată anumite modificări nespecifice sau chiar un traseu de tip „*burst suppression*”. Aceşti pacienţi răspund prompt la administrarea i.v. de piridoxină (în doze de 50-100 mg) şi sunt, prin urmare, dependenţi de administrarea piridoxinei pe tot parcursul vieţii. Din punct de vedere clinic,

aceşti pacienţi mai asociază hipotermie, distonie neonatală, şi simptome caracteristice (reprezentate de iritabilitate, nelinişte şi vărsături) care preced crizele epileptice (123, 14).

"Studiile genetice efectuate în cazul unor probanzi ai căror părinţi erau consangvini, au permis localizarea genei în regiunea cromosomială 5q31, iar investigaţiile biochimice au depistat creşteri ale concentraţiei acidului pipecolic în plasma şi l.c.r-ul copiilor cu *epilepsie dependentă de piridoxină.* În plus, investigaţii ulterioare ale pacienţilor cu această anomalie au identificat mutaţii ale genei (notată ALDH7A1) implicată în codificarea *dehidrogenazei semialdehidei α-aminoadipice* (numită şi *antiquitina*). Pe de altă parte, reducerea activităţii antiquitinei este însoţită de creşterea concentraţiei acidului pipecolic" (116) (37).

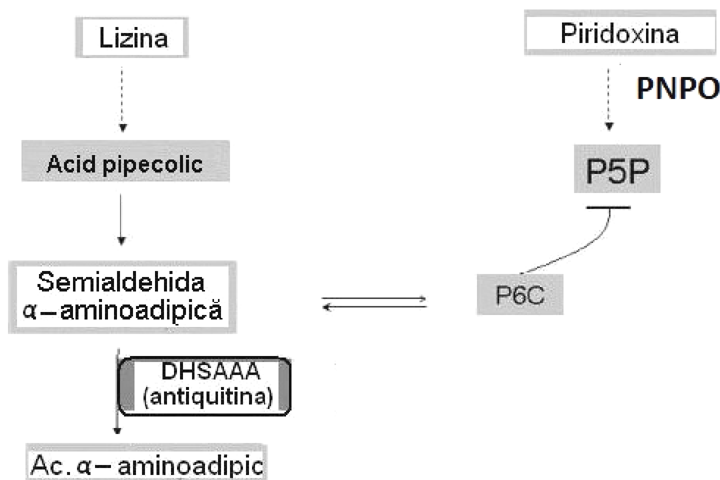


Fig. 18. Reprezentarea căilor metabolice implicate în epilepsia dependentă de piridoxină (modif. după date din literatură, preluată din 116).

DHSAAA: dehidrogenaza semialdehidei *α*-aminoadipice (antiquitina);
P6C: delta piperidein-6-carboxilat;
PNPO: piridox(am)in oxidaza;
P5P: piridoxal-5 fosfat.

S-a arătat că la nivel biochimic, deficienţa antiquitinei produce acumularea acidului pipecolic şi P6C, iar acesta din urmă „*sechestrează*" P5P, forma biologic activă a piridoxinei. Conversia piridoxinei în P5P este catalizată de PNPO [piridox(am)in oxidaza] (15, 75, 76).

Deficitul de antiquitină este cea mai comună formă de epilepsie dependentă de piridoxină (vitamina B6). Cel mai frecvent, tabloul clinic este evident în perioada neonatală prin convulsii mioclonice și tonice sau chiar „status epilepticus”, dar s-a consemnat și posibilitatea de debut la vîrste mai mari (chiar până la 3 ani). Aproximativ o treime dintre nou-născuții afectați au în istoricul medical cel pușin un episod de asfixie și, în unele cazuri encefalopatie (caracterizată de iritație, insomnie); de asemnea, s-au înregistrat modificări asociate de tipul hipoglicemiei, acidozei lactice sau chiar abdomen acut. Modificările EEG pot fi nespecifice (traseu discontinuu și chiar descărcări focale sau, mai rar, traseu de tip ”burst suppression”). Convulsiile sunt de obicei rezistente la anticonvulsivantele comune, cu excepția unui posibil răspuns (parțial sau tranzitoriu) la fenobarbital. Examinările imagistice nu sunt specifice, însă pot arăta diminuarea corpului calos, chisturi în fosa posterioară sau anomalii de structură ale substanței albe (102, 123).

Diagnosticul este confirmat prin secvențierea genei ALDH7A1 prin metoda Sanger. Au fost descrise peste 70 de mutații diferite, fără a se identifica o corelație clară genotip - fenotip. Mutația E427Q s-a înregistrat la cca 30% din toate alelele mutante din Europa, a fost încadrată ca fiind severă, are ca rezultat o deficiență enzimatică completă. Delețíile în gena ALDH7A1 pot fi detectate numai prin tehnici de MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) (102).

Tratament și prognostic: În cele mai multe cazuri administrarea de piridoxină, 100 mg iv. sau p.o., duce la încetarea promptă a convulsiilor. În aproximativ 14% din cazuri răspunsul la piridoxină a fost neclar, și de aceea s-a indicat administrarea de 30 mg/kg corp în 2 până la 3 doze, timp de trei zile consecutive pentru a identifica și pacienții cu răspuns pozitiv, dar întârziat. Deoarece prima administrare de piridoxină poate duce la apnee severă, această administrare trebuie făcută în condiții de terapie intensivă, cu posibilitatea de resuscitare. Aproximativ 90% dintre pacienți au prezentat stoparea completă a convulsiilor prin monoterapia cu piridoxină. Pentru a preveni efectele secundare ale piridoxinei, cum ar fi neuropatia periferică, dozele nu trebuie să depășească 300 mg/zi. În ciuda controlului complet al crizelor, doar 25% dintre acești pacienți prezintă o dezvoltare normală. Acest lucru se poate datora unei posibile acumulări de metaboliți toxici din calea metabolică a lizinei, care nu se normalizează la tratamentul cu piridoxină. Prin urmare, sunt încercate și terapii cu restricția lizinei, dar suplimentarea cu arginină. Tratamentul prenatal

cu 100 mg de piridoxină încă de la 3 luni de sarcină poate avea rezultate bune, și necesită testarea rapidă după naștere, deoarece un copil provenit dintr-o sarcină cu rosc, dar care s-a arătat că nu avea defectul genetic, a avut semne pro-convulsive după administrarea de piridoxină în doze mari. La unii pacienți cu deficit de antiquitină s-a observat un beneficiu suplimentar prin administrarea de acid folinic, în special în perioada neonatală sau copilărie (în doze de 3-5 mg/kg/zi) ca asociere la piridixină. De aceea, fără a cunoaște pe deplin mecanismul efectului benefic al acidului folinic, se recomandă pentru acești pacienși asocierea acidului folinic în doze menționate (102, 123).

III.7. Defecte în metabolismul creatinei

Creatina este principalul compus implicat în metabolismul energetic din citosolul anumitor celule. Sinteza creatinei presupune două procese succesive: primul, de sinteză din arginină și glicină a ornitinei și guanidinoacetatului (prin activitatea enzimei arginin-glicin amidino transferaza – AGAT); apoi, enzima guanidinoacetat metil transferaza (GAMT) catalizează sinteza guanidinoacetatului la care o grupare metil ($-CH_3$) este adăugată prin intermediul S-adenozilmetioninei prin participarea GAMT, generându-se astfel creatina (41, 61, 110).

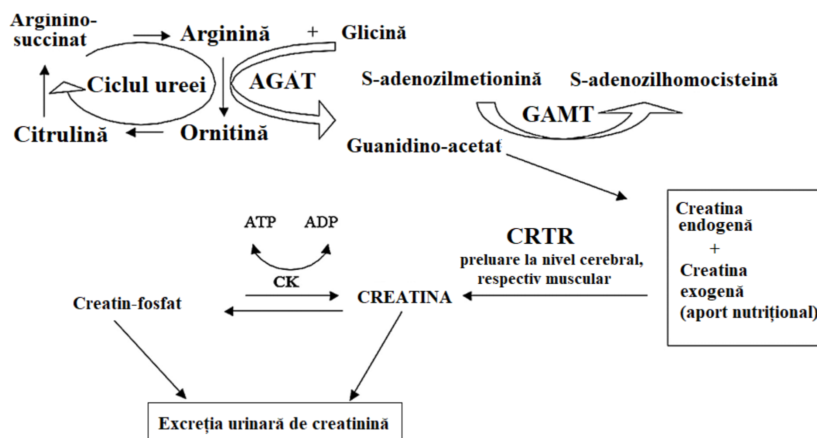


Fig. 19. Sinteza creatinei (schemă concepută după date din literatură - 58)

Transportorul creatinei este notat CRT, sau SLC6A8 și asigură intrarea creatinei în celule la nivel cerebral, muscular. Produsul final de metabolizare este creatinina care se elimină prin urină (58, 123).

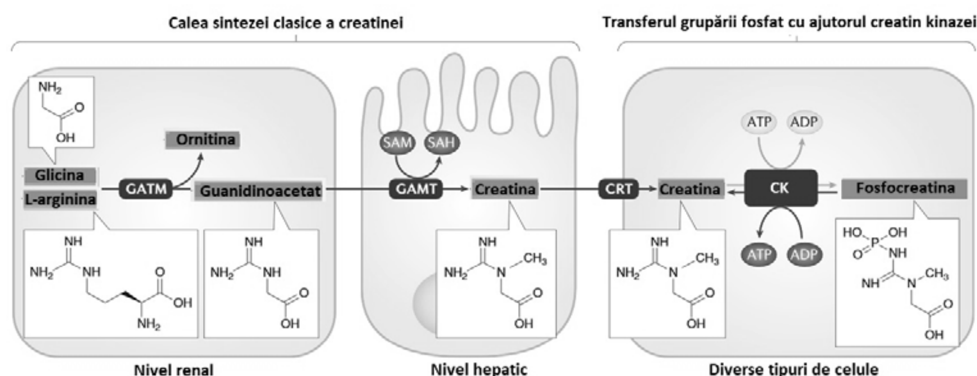


Fig. 20. Calea sintezei endogene a creatinei cu localizările proceselor biochimice, schemă modif. după Kazak și Cohen, 2020 (58), CK: Creatin Kinaza, SAH: Sulf-adenozilhomocisteina; SAM: Sulf-adenozilmetionina.

În rinichi, glicin-amidino transferaza (GATM) catalizează sinteza guanidinoacetatului, iar acesta este exportat în circulație și preluat de hepatocite; la acest nivel, guanidinoacetat-N-metiltransferază (GAMT) îl transformă în creatină, care eliberată din hepatocite în circulaţie, și este preluată de celule care exprimă transportorul de creatină (CRT). Creatina poate fi fosforilată la fosfocreatină prin participarea creatin kinazei (CK), cu consum de ATP. În perioadele de cerere mare de energie (consum ridicat de ATP), fosfocreatina poate fi utilizată în sens invers de creatin kinază pentru a reface stocul de ATP (58, 110). Deși mulți ani s-a considerat că originea creatinei cerebrale este periferică, în ultimii ani s-a arătat că la nivel cerebral se realizează sinteza creatinei (prin participarea celor două enzime AGAT și GAMT care sunt exprimate și la nivel cerebral); de asemenea, s-a identificat în creier și transportorul creatinei (SLC6A8) la nivelul capilarelor endoteliale din structura barierei hemato-encefalice (BHE), fiind absent în astrocite, și s-a concluzionat că BHE are o permeabilitate limitată pentru creatina provenită din structurile periferice. Deficiențele în biosinteza sau transportul creatinei se manifestă prin anomalii neurometabolice care evoluează cu disfuncții neurologice progresive,

cauzând retard mental, anomalii în dezvoltarea limbajului și epilepsie prin deficiența cerebrală a acestui substrat energetic (41, 58).

Diagnosticul acestor anomalii este stabilit prin analiza urinară şi serică a creatinei şi guanidinoacetului; terapia acestor pacienţi se face prin administrarea creatinei.

Tabel IX. Caracteristici biochimice importante în diagnostic (6, 9, 58, 110)

	Creatina în SNC (evaluare prin spectroscopie RMN)	**Raportul guanidino acetat (urină/plasmă/l.c.r.)**	**Creatinina (urină 24h)**	**Raportul ur. creatină/ creatinină**
AGAT	↓↓	↓↓	(↓)	-
CRT	↓↓	**normal**	(↓)	↑
GAMT	↓↓	↓↓	↓	**-**

III.8. Deficienţa sulfit oxidazei

1) *Deficienţa sulfit oxidazei* este cauza formelor severe de encefalopatie epileptică şi poate fi diagnosticată prin analiza urinară pentru prezența de compuși sulfit. Aşa cum se observă în figura alăturată, homocisteina poate fi condensată cu serina formând cistationina prin intermediul unei reacţii catalizate de *cistationin β-sintaza* (CBS), enzimă dependentă de piridoxal fosfat, aparţinând familiei liazelor şi notată cu cifra 4 (9, 116):

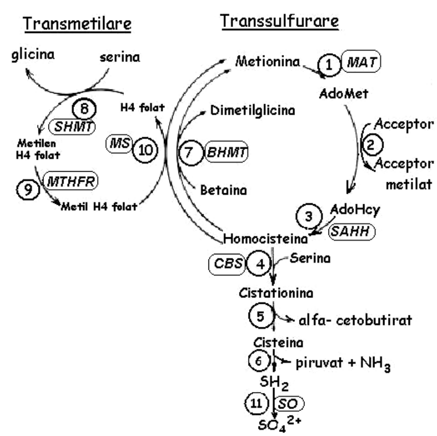


Fig. 21. Schema proceselor implicate în producerea, transsulfurarea şi transmetilarea homocisteinei (Hcy); schemă modif. după date din literatură, preluată din 116.

AdoMet: Sulf-adenozilmetionină (notată şi SAM);

AdoHcy: Sulf-adenozilhomocisteină (notată şi SAH);

H_4 folat: tetrahidrofolat;

Metilen H_4 folat: 5-10 metilentetrahidrofolat;

Metil H_4 folat: 5-metiltetrahidrofolat.

Reacţii catalizate enzimatic:
1: Metionin Sulf-adenoziltransferaza (MAT);
2: Diverse metiltransferaze;
3: Sulf-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH);
4: Cistationin β-sintaza (CBS),
5, 6: γ-cistationază, L-cistationin cistein liaza – dezaminantă;
7: Betain: homocistein- metiltransferaza (BHMT);
8: Serin hidroximetiltransferaza (SHMT);
9: Metilentetrahidrofolat reductaza (MTHFR);
10: Metionin sintetaza (MS), enzimă numită şi N^5–metiltetrahidrofolat: homocistein metiltransferaza;
11: Sulfit oxidaza (SO).

Aşa cum se vede în reprezentarea figurii 21, "cistationina este apoi scindată în α-cetobutirat şi cisteină prin intervenţia enzimei *γ-cistationază* (o altă enzimă care necesită piridoxal fosfat). Cisteina formată este apoi catabolizată [via cistein sulfinat (un precursor al aminoacidului taurina, component al acizilor biliari] la sulfit (SH_2). Ultima etapă (reacţia 11) corespunde oxidării sulfitului la sulfat (SO_4^{2+}, care va fi excretat prin urină) reacţie catalizată de enzima *sulfit oxidaza (notată SO)*, o metaloenzimă mitocondrială care are un cofactor de tip molibdopterin (include molibdenul)" (116). Trebuie ţinut cont de faptul că analiza aminoacizilor nu este întotdeauna utilă pentru diagnosticul deficienţei de sulfit oxidază; atunci când anomalia este dată de deficienţa cofactorului molibden, există şi o deficienţă a xantinoxidazei, anomalie detectată prin analiza purinelor urinare. Până în prezent nu există o terapie specifică a acestei anomalii (9, 123).

III.9. Deficienţa congenitală (genetică) a proteinei de tip transportor al glucozei (GLUT1) de la nivelul barierei hematoencefalice

D-Glucoza și alte monozaharide sunt substanțe hidrofile care nu pot traversa cu ușurință bistratul lipidic al membranei celulare. Se știe că aceste glucide sunt cele mai importante pentru furnizarea energiei în majoritatea tipurilor de celule, și există mecanisme specifice de transport: proteine încorporate în membrana celulară funcționând ca pori hidrofili care permit captarea și eliberarea glucozei, transportul celular și detectarea (generarea unui potential membranar fără transport) a acestor glucide (1, 44, 108).

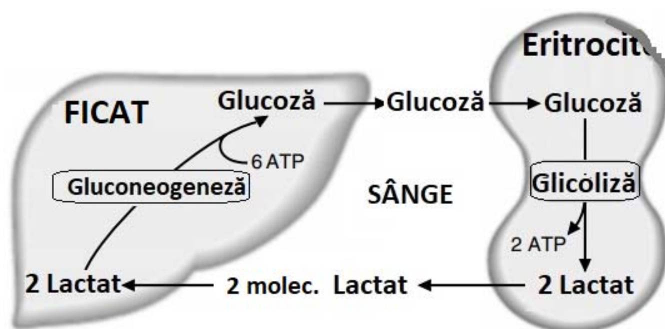


Fig. 22. Reprezentarea ciclului Cori (schemă modif. după 1, 108)
Glucoza, produsă în ficat prin gluconeogeneză; ea este metabolizată prin glicoliză în mușchi, hematii (eritrocite) și multe alte celule, în lactat; lactatul revine în ficat și este reconvertit în glucoză prin gluconeogeneză

Proteinele transmembranare care asigură transportul moleculelor de glucoză pot fi împărțite în două categorii (102):

a) transportori de glucoză cuplată cu gradiente ionice - care asigură transportul glucozei prin transport activ cuplat cu un gradient de sodiu; sunt deci sisteme simport, și sunt codificați de membri ai familiei genelor *solute carrier* 5 - SLC5, formând un cuplu pentru transportul glucozei în sensul gradientului electrochimic dat de sodiu și, prin urmare, poate transporta glucoza chiar impotriva gradientului său de concentrație;

b) transportorii care asigură transportul facilitat (GLUTs, sisteme uniportor) care nu necesită energie – deci este vorba de transport pasiv, prin proteine codificate de gene din familia *solute carrier* 2- SLC2, și care pot transporta monozaharide numai în sensul gradientului electrochimic.

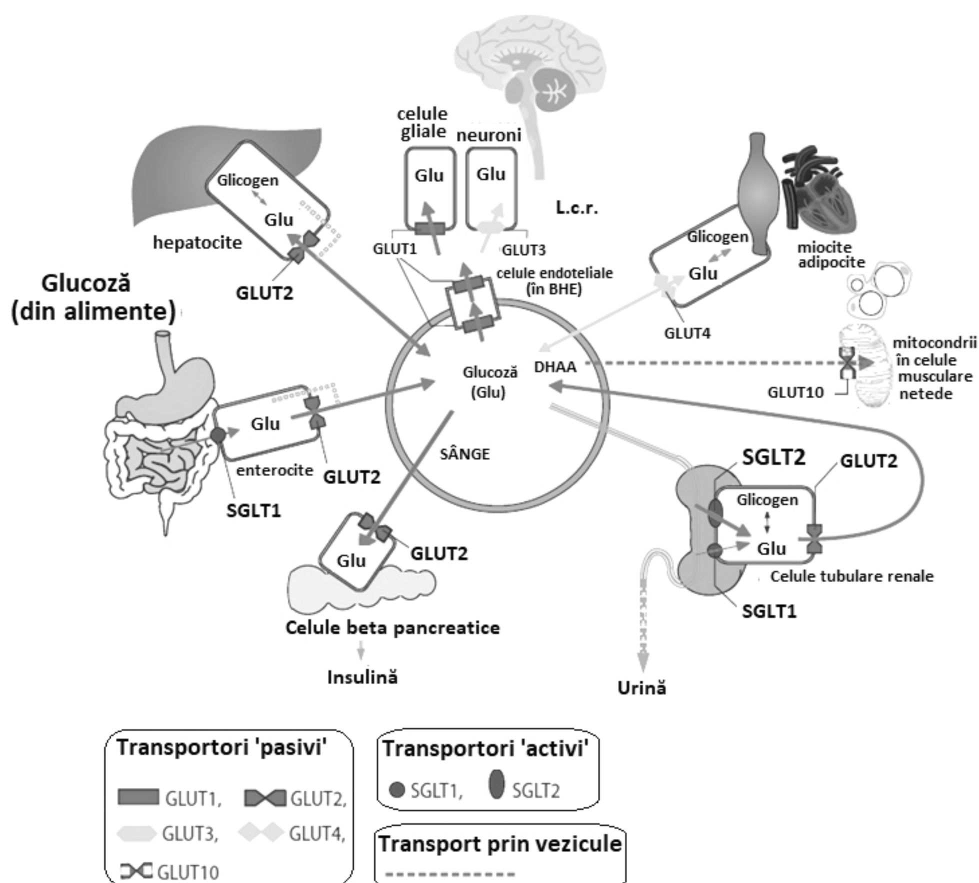


Fig. 23. Principalele căi de transport ale glucozei. Transportul prin membranele celulare este reprezentat de săgeți și de transportori specifici prin simboluri: rotund pentru transportorii dependenți de sodiu, „activi" (SGLT, codificate de membri ai familiei genelor SLC5) și prin simboluri cu unghiuri pentru transportul pasiv, de tip facilitat (GLUT, codificate de membri ai familiei genelor SLC2); Glu: glucoză; l.c.r: lichid cefalorahidian; DHAA: acid dehidro-ascorbic (schemă modificată după 96, 102).

Molecula transportată dintr-o parte a membranei spre cealaltă trebuie să se lege de transportorul proteic și realizează difuziunea pasivă, facilitând deplasarea moleculei dintr-o regiune cu concentrație mare spre una cu concentrație scăzută

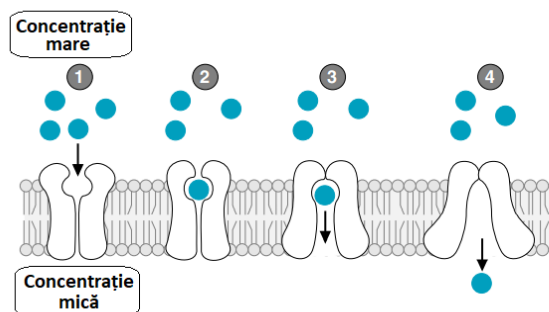


Fig. 24. Modelul transportului pasiv de tip (difuziune) facilitată (de ex. pentru transportorii SLC2), modif. după 108;
Termenul „pasiv" se referă la absența necesității consumului energetic pentru transport.

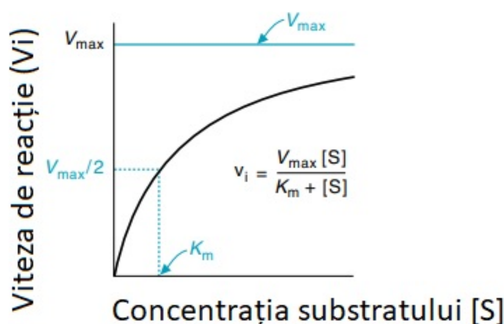


Fig. 25. Caracteristici de cinetică pentru transportorii care asigură difuziunea facilitată, graficul ecuației Michaelis-Menten (1, 108);
V_{max} (linia orizontală continuă) este viteza inițială extrapolată la infinit. K_m (linia albastră punctată) este concentrația substratului (S) la care viteza de transport (sau de reacție) este jumătate din viteza maximă.

Se cunosc 4 defecte monogenice care afectează o parte din transportorii monozaharidelor. Tabloul clinic al acestor deficienţe depinde atât de exprimarea specifică a fiecărui transportor în diferite ţesuturi, precum şi de specificitatea substratului caracteristică fiecărei proteine transportor. Defectele genetice care afectează transportorul ***GLUT2*** (un important transportor al glucozei şi galactozei în ficat, rinichi şi celulele β-insulare pancreatice) se manifestă prin sindromul Fanconi-Bickel, pacienţii având o afectare hepatică

(cu alterarea depozitării glicogenului) şi o disfuncţie generalizată tubulară renală care include glicozurie severă (9, 116).

"Sistemul nervos central este sever afectat în deficienţa genetică a transportorului ***GLUT1*** care asigură în mod normal trecerea glucozei la nivelul barierei hematoencefalice spre neuroni şi celulele gliale; deficienţa acestui transportor (numită şi *boala De Vivo*) se manifestă clinic prin encefalopatie epileptică şi microcefalie. Tabloul clinic al bolii este caracterizat prin debutul la sugar al encefalopatiei epileptice (epilepsia apare în cursul primului an de viaţă, pe măsură ce cresc necesităţile energetice ale creierului); se asociază apoi microcefalia şi retardului psihomotor. În plus, la aceşti copii s-a descris şi ataxia asociată spasticităţii (89% dintre pacienţii diagnosticaţi cu această deficienţă), distonia membrelor (86%), şi altele, sugerând-se afectarea secundară a unor NT. Diagnosticul de laborator permitea diagnosticul prin stabilirea glicorahiei (care are valori scăzute) şi a raportului glucoză în l.c.r./glucoză în sânge. Valorile normale ale acestui raport sunt de 0,65±0,1, iar în această boală genetică raportul menţionat are valori <0,3. În plus, dozarea lactatului în l.c.r. poate avea valori normale sau scăzute" (116). Cu toate acestea, s-au raportat rezultate greu de încadrat, și de aceea, genetica moleculară sau indentificarea unui transport deficitar (prin alte metode- neinvazive) de analiză în membrana eritrocitelor a ameliorat posibilitatea de diagnostic de laborator (123).

"Tratamentul şi prognosticul acestei boli se bazează pe faptul că, în condiţii fiziologice, ca răspuns la o perioadă de post alimentar se formează la nivel hepatic corpi cetonici care pot penetra bariera hematoencefalică şi astfel constituie un combustibil alternativ pentru creier. Această situaţie poate fi reprodusă în cazul unei alimentaţii bazate pe un raport crescut *lipide:glucide* (în favoarea lipidelor) – alimentaţie numită *dietă cetogenă (DC)* " (116). Această dietă presupune că aportul zilnic al compușilor nutritive trebuie să respecte raportul lipide:(glucide+prot) într-o proporție de 4:1 sau 3:1 (123). Acest tip de dietă a fost "prescrisă iniţial copiilor cu epilepsie rezistentă la tratament; în acest fel s-a asigurat la nivel cerebral un aport energetic important pentru metabolismul creierului, iar clinic s-a obţinut un control bun al crizelor epileptice, în absenţa administrării unor preparate medicamentoase" (116).

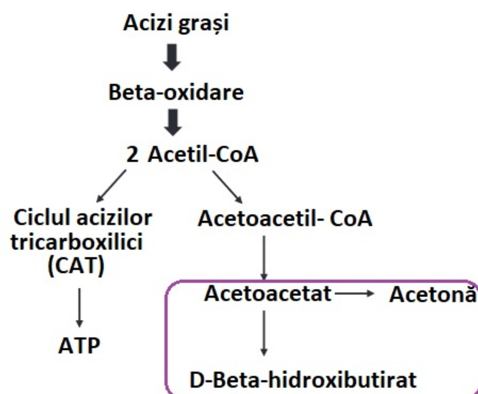


Fig. 26. Sinteza corpilor cetonici (acetoacetatul, acetona, D-beta- hidroxibutiratul)
Acizii grași sunt transformați în acetil-CoA prin β-oxidare. Acetil-CoA poate apoi să intre în ciclul acizilor tricarboxilici (CAT) pentru a genera ATP, sau 2 molecule de acetil-CoA sunt condensate în acetoacetil-CoA. Acetoacetil-CoA este apoi utilizat pentru a produce acetoacetat care poate fi utilizat pentru a produce fie acetonă, fie D-β-hidroxibutirat; schemă modificată după Steiner 2020 (9).

În mod similar, s-a indicat administrarea unei diete cetogene şi pacienților cu deficienţa GLUT1 în cursul copilăriei şi chiar a adolescenţei – când cererile de glucoză scad spre nivelul observat la adulți. Prognosticul bolii este bun atunci când terapia este inițiată timpuriu. În plus, trebuie evitată administrarea inhibitorilor GLUT1 cum sunt (102. 116):

- unele anticonvulsivante (fenobarbitalul, cloralhidratul, diazepamul),
- metilxantinele (teofilina, cofeina),
- alcoolul, ceaiul verde.

"Dacă dieta cetogenă (DC) nu este bine tolerată, sau crizele epileptice nu sunt controlate suficient de bine, se pot asocia medicamente antiepileptice (*carbamazepina* sau *fenitoina*) care nu interferă cu transportorul GLUT1. În plus, sunt recomandate asocierile cu antioxidanţi precum acidul α-lipoic (administrat în doze de 600-1800 mg/zi divizate în trei doze) " (116).

Din punct de vedere metabolic, o reprezentare legată de aportul lipidic și comparația absorbției acizilor grași cu lanț mediu- AGLM (MCFA- *medium chain fatty acids*) și a acizilor grași cu lanț lung AGLL (LCFA- *long chain fatty acids*). Moleculele de AGLM sunt rapid absorbite din intestin și ajung direct în ficat prin vena portă. AGLL sunt molecule mai întâi integrate în chilomicroni și apoi sunt absorbite din circulația periferică în principal prin sistemul limfatic înainte de a ajunge la organele țintă, inclusiv în ficat. La acest nivel (AGLM și

AGLL) sunt transformați în corpi cetonici (CC) care sunt apoi eliberați în circulația periferică înainte de a ajunge la creier prin bariera hematoencefalică (BHE). Corpii cetonici (CC) sunt apoi convertiți în acetil-CoA, moleculă care este metabolizată pentru a produce fie colesterol în reticulul endoplasmatic neted, fie energie sub formă de ATP prin ciclul acizilor tricarboxilici (CAT) din matricea mitocondrială (108, 109).

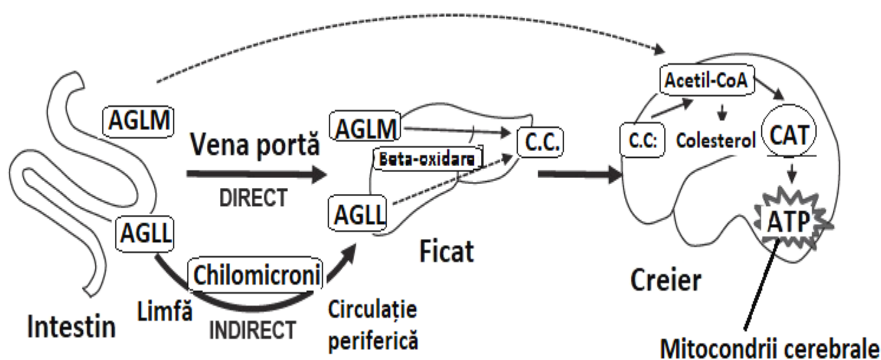


Fig. 27. Reprezentarea aportului lipidic și comparația absorbției diferite a acizilor grași cu lanț mediu - AGLM (MCFA- *medium chain fatty acids*) și a acizilor grași cu lanț lung AGLL ca substrat pentru obținerea corpilor cetonici –CC; schemă modificată după Steiner 2020 (109).

Contraindicații legate de patologia coexistentă în cazul introducerii dietei cetogene (9, 123):
- defectele genetice afectând oxidarea acizilor graşi
- def ale complexelor mitoc (excepţie complexul I)
- boli hepatice grave
- deficienţa piruvat carboxilazei (PC)
- noncomplianţa pacientului.

După introducerea acestei diete, s-a consemnat (102, 123) apariția unor efecte secundare care, în funcție de momentul apariției lor, au fost atribuite efectelor secundare pe termen:

a) *scurt*: greaţă, vărsături, hipoglicemie, acidoză, somnolenţă, deshidratare, refuzul alimentaţiei;

b) *lung*: constipaţie, litiază renală, demineralizări osoase, profil lipidic anormal, tulburări de creştere.

Câteva concluzii legate de defectele primare din metabolismul neurotransmițătorilor (4, 44, 38, 102, 114, 123):

1. Defectele congenitale din metabolismul neurotransmițătorilor sunt recunoscute ca fiind cauzele importante ale encefalopatiilor severe, progresive, mai ales cu debut precoce.
2. Tabloul clinic al pacienților cu aceste defecte poate fi marcat uneori de elemente tipice; de exemplu, pacienții cu defecte de tip hiperglicinemie noncetotică (NKH), defecte legate de transportul glutamatului, sau deficiența GABA-transaminazei. În aceste cazuri, simptomatologia impurie este marcată de obicei prin encefalopatie severă dominată de convulsii refractare la tratamentul medicamentos. De asemenea, defectele din metabolismul piridoxinei au un tablou clinci similar. S-au introdus unele terapii bazate pe cunoștințele legate de mecanisme moleculare, unele cu efecte minime, satisfăcătoare, dar altele cu rezultate foarte bune.
3. Defectele din biosinteza dopaminei duc, în general, la tulburări de mișcare, semne extrapiramidale progresive de tip parkinsonism, distonie și coree. Cu toate acestea, evoluția bolii este heterogenă, variind de la distonie focală intermitentă, la encefalopatii infantile severe, letale.
4. Diagnosticul biochimic al defectelor din metabolismul neurotransmițătorilor necesită investigații biochimice specificce ale l.c.r.-ului.
5. În cazul unor deficiențe monogenice, tabloul clinic poate prezenta semne mai puțin specifice (cum sunt retardul de dezvoltare, incluzînd și dezvoltarea întârziată a limbajul, hipotonie), iar diagnosticul de certitudine se poate obține fie prin teste de genetică moleculară, fie prin studiul biochimic al unor fluide biologice (urină, sânge și l.c.r). De exemplu, în cazul deficienței dehidrogenazei semialdehidei succinice (SSADH) se vor identifica valori crescute ale acidului 4-hidroxibutiric în toate cele 3 tipuri de fluide biologice.

IV. DEFECTE GENETICE CU AFECTAREA SECUNDARĂ A METABOLISMULUI CEREBRAL

IV.1. Anomalii din metabolismul unor aminoacizi, fenilcetonuria – un exemplu

Aminoacidopatiile tipice sunt cauzate de defecte ale catabolismului citosolic al aminoacizilor; din totalul defectelor care afectează metabolismul aminoacizilor, *deficienţele catabolice* sunt evident mai numeroase decât *deficienţele anabolice (9, 123)*.

Cea mai frecventă aminoacidopatie este o anomalie legată de metabolismul fenilalaninei (phe) numită fenilcetonurie (PKU) şi determinată de deficienţa hidroxilazei fenilalaninei la tirozină (1, 116):

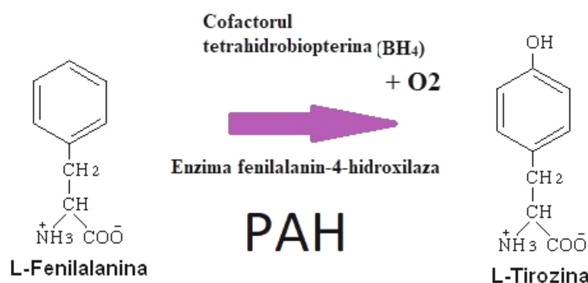


Fig. 28. ***Schema*** simplificată a hidroxilării L- fenilalninei (după date din literatură)

"Aşa cum Følling a denumit în 1934 această afecţiune „*imbecilitate fenilpiruvică*", s-a arătat că pacienţii netrataţi suferă de o afectare neuropsihică progresivă, ireversibilă (cu atât mai severă, cu cât mutaţiile genei PAH determină o activitate enzimatică mai redusă, şi deci un nivel mai crescut al fenilalaninei plasmatice). Catabolismul complet al fenilalaninei la dioxid de carbon şi apă se face în mod normal printr-o primă etapă de hidroxilarea ireversiblă a fenilalaninei la tirozină (reacţie care are loc în principal în hepatocite, dar şi în rinichi sau pancreas) şi se face în prezenţa oxigenului, a fenilalaninhidroxilazei (PAH) şi a cofactorului acestei enzime numit *tetrahidrobiopterina* (BH_4)" (116).

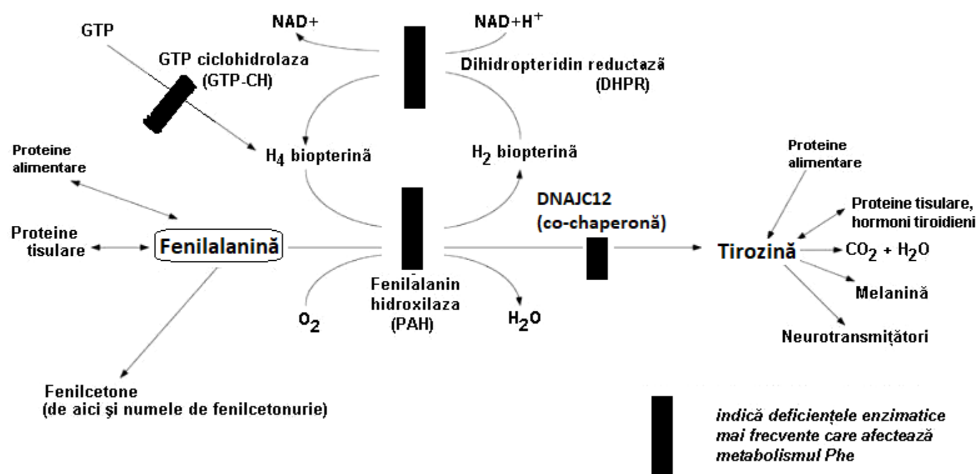


Fig. 29. Schemă simplificată a metabolismului fenilalaninei, implicând deficiențele mai frecvent identificate; s-a adăugat și deficiența mai recent descrisă - DNAJC12- genă care codifică o proteină cu rol de co-chaperonă; mutații în această genă au fost descrise recent la pacienții cu hiperfenilalaninemie (schemă modificată după 9, 13)

Incidenţa în globală a hiperfenilalaninemiei este de cca 1 caz la 10 000 de nou-născuţi vii în populaţia Caucaziană sau orientală; în țara noastră, ca urmare a unor evaluări în urma screening-ului neonatal este considerată tot cu această valoare (comunicare D. Anton-Păduraru, 2017). Există variaţii geografice şi etnice în incidenţa fenilcetonuriei clasice (de la 5 la 350 de cazuri/ 1 milion de naşteri, în funcţie de regiune şi populaţie). O incidenţă crescută s-a apreciat în Turcia (1 caz la 2600 naşteri), în anumite regiuni din nordul şi estul Europei, la populaţia evreiască yemenită, în Italia, Estonia (1 caz la 8 090 naşteri); în schimb, o incidenţă mai scăzută s-a înregistrat in Finlanda (1 caz la 100 000 naşteri). Aprecierea incidenţei fenilcetonuriei clasice în S.U.A. a arătat un raport de aproximativ 1 caz la 15 000 naşteri (123, 116).

Cercetările recente au arătat că există o serie de factori implicaţi în fenotipul PKU, cum sunt: toleranţa la Phe, menţinerea Phe plasmatice într-un interval constant (fără variaţii mari), rata de transport a aminoacizilor aromatici din plasmă la nivelul epiteliului BHE prin utilizarea transportorului aminoacizilor voluminoşi neutri (LNAA), intervenţia altor gene care intervin în

metabolismul Phe (gene modificatoare) (9, 123). S-a arătat că, în baza cunoștințelor de genetică moleculară, ”genotipul corespunzător enzimei PAH nu este un predictor riguros pentru evoluţia clinică a pacienţilor cu fenilcetonurie; în acest sens, s-au identificat mai mulţi factori care influenţează variaţia fenotipică în această boală, cum sunt: variaţiile interindividuale ale absorbţiei intestinale, preluarea la nivel hepatic a fenilalaninei din dietă, rata de incorporare a acesteia în proteine, rata de traversare a fenilalaninei a structurilor din bariera hematoencefalică (BHE), mutaţiile care afectează tetrahidrobiopetrina (care acţionează ca un cofactor, protejând de asemenea enzima PAH de degradarea proteolitică), precum şi interacţiunile genei PAH cu alţi loci ” (116).

Funcţia hidroxilării Phe este sub controlul mai multor loci care codifică fie sinteza enzimei fenilalaninhidroxilaza (PAH), fie enzimele necesare sintezei şi reciclării cofactorului tetrahidrobiopterina (BH_4). Deficienţa sintezei sau reciclării cofactorului terahidrobiopterina (BH_4) este urmată de anomalii în metabolismul hidroxilării fenilalaninei, dar implică şi deficienţa altor două hidroxilaze (pentru tirozină şi triptofan), afectând sinteza precursorilor (L-dopa şi respectiv 5-hidroxitriptofan) neurotransmiţătorilor dopamina şi serotonina (49, 51, 123).

“În urma unor observaţii importante privind patogeneza disfuncţiei mentale în PKU, un rol central a fost atribuit transportului *aminoacizilor neutri voluminoşi* [notataţi în lb. engl. LNAA (*large neutral amino acids*)] la nivelul barierei hematoencefalice (BHE). Este binecunoscut faptul că fenilalanina traversează BHE prin intermediul unui transportor comun (notat LAT1 sau SLC7A5) în competiţie cu alţi 8 aminoacizi (valina, leucina, izoleucina, tirozina, triptofanul, treonina, metionina şi histidina). Afinitatea pentru Phe a transportorului menţionat este mare, determinând o rată mare a transportului acestui aminoacid spre creier, chiar dacă valorile plasmatice ale Phe sunt doar uşor crescute. Atunci când nivelul Phe plasmatice este crescut, transportul Phe prin BHE este realizat în mod preferenţial, rezultând o scădere a concentraţiei celorlalţi aminoacizi de tip LNAA în l.c.r.“ (116).

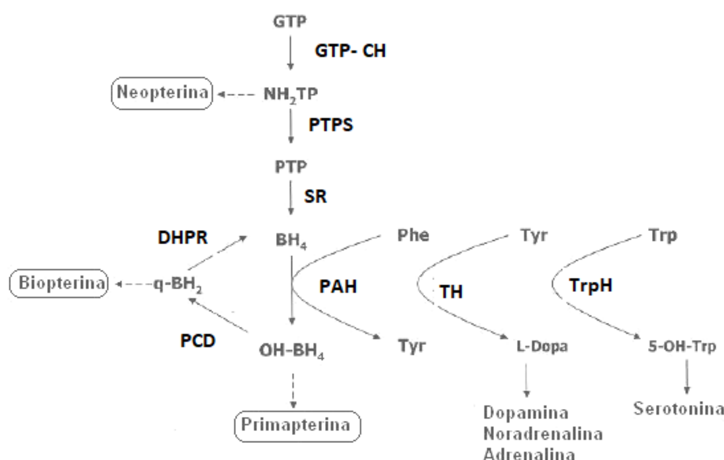


Fig. 30. Reprezentarea simplificată a metabolismului BH_4, implicarea sa în hidroxilarea aminoacizilor aromatici şi marcarea neurotransmiţătorilor formaţi din aminoacizii hidroxilaţi, TH: tirozin hidroxilaza, TrpH: triptofan hidroxilaza (schemă modif. după date din literatură, 116)

Sunt marcaţi prin încadraremarkerii biochimici care se dozează în laboratoarele specializate pentru diagnosticul BGM în vederea identificării defectului biochimic (tipului de enzimă) care afectează metabolismul normal al BH_4 (schemă modif. după Blau N., 2006).

GTP-CH: Guanozintrifosfat ciclohidrolaza I	PCD: Pterin-4α-carbinolamin-dehidrataza
NH_2TP: Dihidroneopterin trifosfat	$q\text{-}BH_2$: quinoid dihidrobiopterina
PTPS: 6- piruvoil-tetrahidropterin sintetaza	PAH: Fenilalanin hidroxilaza
SR: Sepiapterin reductaza	TH: Tirozin hidroxilaza,
BH_4: Tetrahidrobiopterina	TrpH: Triptofan hidroxilaza
$OH\text{-}BH_4$: 4α-hidroxi-tetrahidrobiopterina	5-OH-Trp: 5-Hidroxi triptofan
DHPR: Dihidropteridin reductaza	

Cele mai importante repere istorice legate de fenilcetonurie

Fenilcetonuria (PKU) a fost descoperită de medicul norvegian Asbjorn Følling; acest medic "a denumit în 1934 această anomalie *„oligofrenia fenilpiruvică"*, redenumită de către Penrose şi Quastel după câţiva ani (1937) *„fenilcetonurie"* sugerând prezenţa produşilor metabolici secundari care se formează în această boală şi care se elimină în urină („-urie"). Descoperirea PKU s-a dovedit a fi un eveniment important pentru Garrod (aşa cum prezintă Alexander Bearn în biografia intitulată *Archibald Garrod and the Individuality of Man* 1993) care a fost atenţionat atât de Penrose, cât şi de Følling despre boala nou descoperită. A fost un eveniment important pentru că fenilcetonuria a oferit câteva evidenţe ale *„individualităţii chimice umane"* şi pentru *„existenţa*

căilor metabolice", concepte pe care Garrod le-a formulat mai devreme (1902) şi pe care le-a dezvoltat mai târziu (1908) în cadrul prestigioaselor prelegeri *„Croonian lectures"* ţinute la invitaţia Societăţii Regale a Medicilor din Londra" (116). Lionel Penrose (1898-1972) a contribuit la înţelegerea fenilcetonuriei; interesul său deosebit pentru cauzele retardului mental, concretizat în cartea *„The Biology of Mental Defect"* (Londra, 1949), l-a condus la presupunerea că afectarea mentală a pacienţilor fenilcetonurici netrataţi are o cauză biochimică endogenă. Pentru că L-phe este un aminoacid esenţial în nutriţia şi metabolismul uman, Penrose a fost primul care a considerat că modificarea alimentaţiei ar putea neutraliza efectul devastator al *„condiţiei mutante"* din fenilcetonurie. Locul defectului molecular din această boală a fost descoperit de Jervis în 1953 care a observat că preparatele hepatice provenite de la pacienţi cu fenilcetonurie nu pot realiza în sisteme *in vitro* hidroxilarea fenilalaninei la tirozină. Au urmat observaţiile lui Bickel şi colab. (1954) care au arătat că o dietă cu o concentraţie scăzută în phe poate preveni hiperfenilalaninemia din fenilcetonurie cu beneficii asupra funcţiilor cognitive. Această recunoaştere a constituit un *„model nou"* în abordarea medicală privind bolile genetice în general. În anii 1980, progresele genetice au permis localizarea genei PAH pe cromosomul 12 şi catalogarea sa în baza de date *GenBank*. David Konecki şi colab. au obţinut mai târziu secvenţa completă a acestei, iar în anii 1990 s-a constituit un *Consorţiu de analiză a mutaţiilor genei PAH* unde au fost înregistrate până în 2021 peste 1200 de tipuri de mutaţii. Enzima PAH a fost de asemenea cristalizată în anii 1990, iar structura sa (descrisă la o rezoluţie de 2 Ǻ) permite explicarea efectelor unor mutaţii ale genei PAH (102, 116).

Studii ulterioare "au arătat că anumite variante mutante ale alelelor PAH care determină plierea deficitară a proteinelor PAH răspund la administrarea dozelor farmacologice de BH_4, acesta îndeplinind un efect terapeutic de tip *„chaperone-like"*. Studiul lui Zurflüh MR, 2008, referitor la tipurile de mutaţii ale genei PAH asociate formelor de fenilcetonurie cu *răspuns pozitiv la administrarea tetrahidrobiopterinei* (RPAT), a arătat că aproximativ 50% din totalul pacienţilor cu deficienţa PAH (cauzate de mutaţii mai puţin severe) prezintă o ameliorare fenotipică după administrarea cofactorului BH_4. De asemenea, studiul arată că, deşi nu există o corelaţie absolută între genotipul şi fenotipul acestor pacienţi, analiza moleculară aduce informaţii utile privind selectarea pacienţilor a cărui terapie cu BH_4 ameliorează considerabil fenotipul bolii" (116); cu toate acestea, studiile clinice pentru pacienţii cu PKU pentru care s-a identificat genotipul şi

s-a încadrat din punct de vedere al activității enzimatice restante ca fiind de tip „*null mutation*" (fiind asociate formelor severe de boală) nu s-au înregistrat ameliorări fenotipice după administrarea cofactorului BH_4 (11, 116).

Astăzi, ca urmare a cunoștințelor clinice și de laborator, hiper-fenilalaninemia este asociată modificărilor genetice de tip mendelian și este considerată o afecțiune „*multifactorială*", fiind rezultatul mai multor cauze: atât a genotipului mutant, cât şi a aportului fenilalaninei prin dietă. Astfel, s-a arătat că există atât o *heterogenitate de locus* (numită şi heterogenitate genetică) - caracterizată prin realizarea unor fenotipuri identice sau asemănătoare prin anomalii genetice diferite (defecte ale genelor care codifică PAH, ale genelor care codifică enzimele implicate în sinteza/reciclarea cofactorului BH_4 sau, mai recent identificate – mutațiile genei DNAJC12 – care acționează ca o co-chaperonă în reacția de hidroxilare a fenilalaninei). *Heterogenitatea alelică a genei PAH* este corelată cu faptul că până în prezent sunt descrise peste 1200 de tipuri de mutaţii ale genei PAH care produc fenotipuri diverse (mutațiile ușoare- notate 'mild' vor fi asociate unor cre;teri moderate sau mici ale nivelurilor de fenilalnină plasmatică, iar mutațiile de tip 'null' sunt cele severe, cu niveluri foarte crescute ale fenilalaninei plasmatice (9-11, 13, 116).

IV.2. Aciduriile organice

Aciduriile organice (numite și *acidemii organice*) corespund unor deficienţe monoenzimatice (transmise în marea majoritate a cazurilor prin mecanism autosomal recesiv) și, prin fiziopatologia lor, aparțin defectelor de tip "*intoxication like*" afectând frecvent neurotransmiterea, dezvoltarea creierului (102).

Acizii organici sunt molecule fiziologice care intervin în multe căi metabolice intracelulare din metabolismul intermediar cum sunt: catabolismul aminoacizilor, beta-oxidarea mitocondrială a acizilor grași, ciclul acizilor tricarboxilici, biosinteza acizilor grași și a colesterolului; în mod sintetic, aceste căi metabolice pot fi astfel reprezentate în raport cu metabolismul glucidic, al acizilor grași, aminoacizilor, neurotransmițătorilor (102, 123).

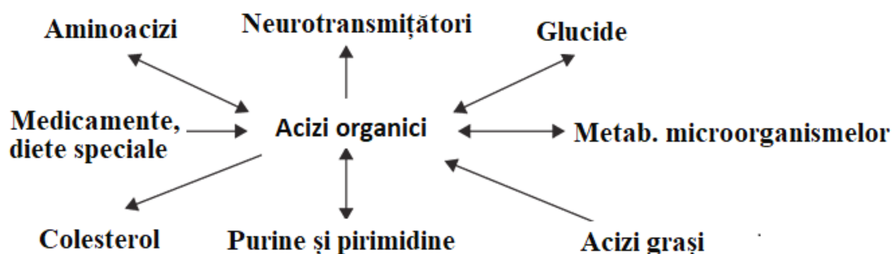


Fig. 31. Reprezentarea căilor metabolice ale acizilor organici (sinteză după date din literatură (17, 123)

Defectele implică enzime mitocondriale răspunzătoare de metabolismul acizilor carboxilici activaţi prin Coenzima A; aceștia rezultă cel mai frecvent din reacţiile catabolice ale aminoacizilor. Biochimic, aceste anomalii se caracterizează prin acumularea precursorilor care au un grad de toxicitate sau sunt degradați spre metaboliți toxici; consecutiv, se înregistrează eliminarea urinară în cantități crescute ale unor acizi organici non-aminici. Acumularea esterilor Acil-CoA este în echilibru cu concentrația moleculelor de acilcarnitine corespunzătoare și care pot fi identificate și cuantificate prin spectrometrie de masă în tandem (TMS). Astfel, analiza acizilor organici prin cromatografie gazoasă cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS), sau chiar prin analiza urinară de tip spectroscopie RMN, permite identificarea defectelor legate de degradarea aminoacizilor, oxidarea acizilor grași, metabolismul colesterolului, al glucidelor sau chiar din metabolismul energetic. Incidența acestor defecte depistate în țările cu screening neonatal extins (prin TMS) este de 1:6000 nou-născuți, și reprezintă în cea mai mare parte a cazurilor boli genetice metabolice severe (116, 123).

Catabolismul aminoacizilor începe cel mai adesea prin îndepărtarea sau transaminarea grupării alfa-aminice, iar prin asocierea aciduriilor organice corespunzătoare, produse prin defecte mai distal, acumularea acizilor organici corespunde unei etape anterioare blocajului enzimatic; din punct de vedere practic, este important de știut că nu se înregistrează acumularea aminoacidului inițial corespunzător acelei căi metabolice. Catabolismul complet al multor aminoacizi survine intra-mitocondrial prin decarboxilarea oxidativă, până la derivați ai Coenzimei A, sau prin alte etape cum este dehidrogenarea (beta-oxidativă) a acizilor carbonici activați CoA (așa numiții compuși *acil-CoA*). Aciduriile organice perturbă adesea metabolismul energetic

mitocondrial și predispun la decompensări metabolice acute cu (ceto- sau lacto-) acidoze metabolice. Acumularea compușilor *acil-CoA* este urmată de esterificarea lor cu carnitină liberă pentru prevenirea sechestrării CoA, determinând creșterea concentrației sanguine a acilcarnitinelor. Acest aspect este foarte important atât din punct de vedere fiziopatologic, cât și practic, pentru metodele de diagnostic; aceste molecule pot fi cuantificate prin spectrometria de masă în tandem (TMS). Această tehnică se poate aplica și pentru volume foarte mici de sânge (spoturi recoltate și uscate pe hârtie de filtru specială – de tip Guthrie). Această analiză biochimică stă la baza „screening"-ului neonatal extins care permite identificarea acestor tipuri de boli încă din primele zile de viață (65, 123).

Acidurii organice care afectează neurotransmiterea sunt cele care evoluează cu encefalopatie de tipul bolii Canavan (deficiența aspartoacilazei, aminoacilazei 2, prin mutații în gena ASPA), cu un tablou clinic marcat de afectarea severă a dezvoltării intelectuale, encefalopatie epileptică progresivă, leucodistrifie, atrofie optică (biochimic se identifică valori crescute ale acidului N-acetilaspartic). De aseemenea, aciduria L-2 şi D-2 hidroxiglutarice, aciduria fumarică (dată de deficiența fumarazei), aciduria malonică (prin deficiența malonil-CoA decarboxilazei). În aceste boli stabilirea diagnosticului se face prin analiza acizilor organici urinari cu identificarea unor metaboliţi specifici (în cazul bolii Canavan, disponibilitatea spectroscopiei cerebrale RMN permite înregistrarea concentrațiilor crescute ale acidului N-acetilaspartic în creier). Studiul fenomenelor biochimice au permis în ultimii ani elucidarea mecanismelor moleculare fiziopatologice, însă nu s-a descoperit încă o terapie specifică pentru aceste boli (91, 102, 123).

Tratamentul: este în general similar celui din aminoacidopatii şi poate implica restricţii dietetice pentru anumiţi aminoacizi şi evitarea catabolismului proteic. Suplimentarea cu carnitină şi uneori cu alte substanţe cum sunt glicina (de ex. în aciduria izovalerică pentru a forma izovalerilglicina) sunt foarte utile terapiei (102, 123).

În concluzie, aceste anomalii se diferenţiază de defectele de oxidare ale acizilor graşi care sunt anomalii ce implică esteri ai Coenzimei A, iar metodele de diagnostic şi terapie sunt diferite. Din punct de vedere clinic, semnele pot fi datorate acumulărilor unor compuşi intermediari toxici sau perturbărilor metabolismului mitocondrial energetic şi homeostaziei carnitinei; manifestările clinice sunt cauzate de efectele toxice (progresive, sau uneori intermitente) a

acestor molecule în special asupra creierului (producând encefalopatii cu anumite caracteristici), dar și asupra ficatului, rinichilor pancreasului, retinei și altor organe (116, 123).

O mențiune aparte trebuie făcută în legătură cu anomaliile din metabolismul biotinei; aceste defecte afectează sistemul nervos central, și constituie de fapt o patologie tratabilă cu doze mari de biotină. Astfel, *deficiența biotinidazei* poate fi inclusă în categoria *aciduriilor organice,* deoarece biotina este cofactor al mai multor decarboxilaze mitocondriale (123).

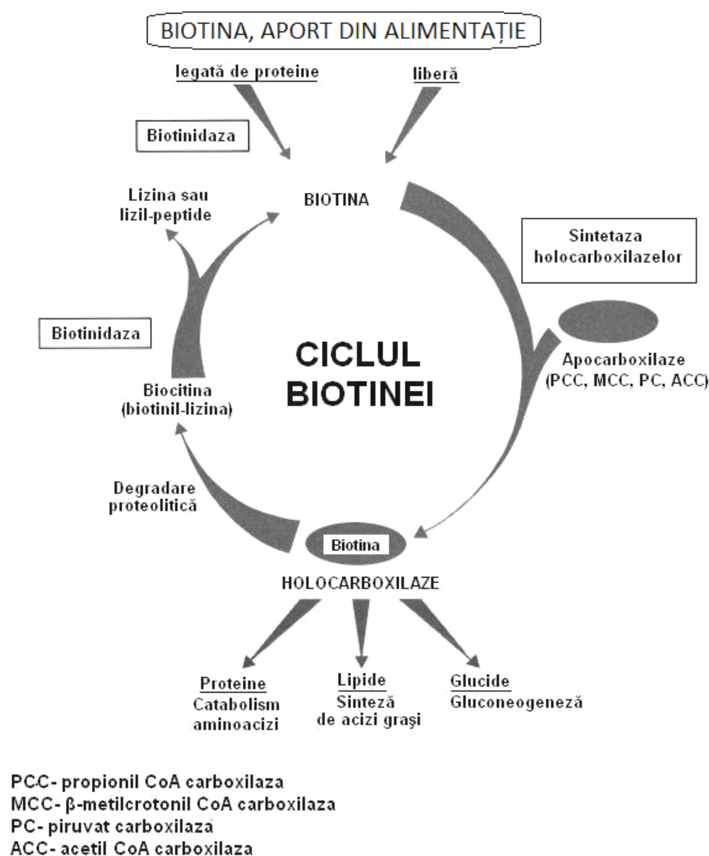


Fig. 32. Schema metabolismului biotinei

(modif. după date din literatură -123)

Deficiența acestei enzime (*biotinidaza*) sau a *sintetazei holocarboxilazei* determină deficiențe în funcționarea mai multor alte enzime de tip *carboxilaze*. Tabloul clinic este marcat de crize de acidoză metabolică, manifestări

neurologice progresive, hipotonie, ataxie, crize epileptice, retard neuro-psihic, rash cutanat, alopecie, deficite imune. Diagnosticul de laborator este sugerat de creşterea lactatului şi amoniacului seric, iar demonstrarea activității scăzute (sau absente) a biotinidazei serice sau testarea moleculară stabileşte diagnosticul de certitudine (102).

Deoarece deficiența biotinidazei se tratează prin administrarea unor doze mari de biotină şi este considerată „cea mai tratabilă" boală genetică de metabolism; netratată, formele severe de boală afecteză ireversibil sistemul nervos central, fiind o boală letală. De aceea, „*screening*" neo-natal extins include testarea la naştere a nou-născuţilor şi pentru această anomalie (123).

IV.3. Tulburări ale îndepărtării amoniacului (defecte în ciclul ureei)

Se știe faptul că metabolismul degradativ al proteinelor determină producția de compuşi azotaţi sub formă de amoniac, compus neurotoxic care, în mod normal, este convertit în uree şi excretat în principal la nivel renal, prin urină (1, 89).

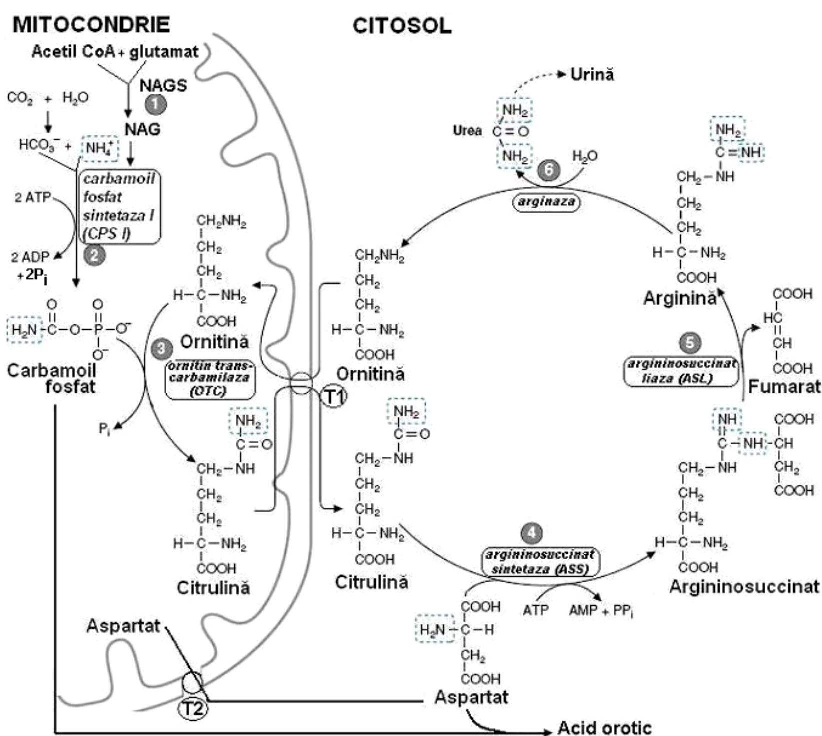


Fig. 33. Reprezentarea substratelor și produşilor necesari în ciclul ureogenetic, cu etape care au loc în citosol şi în mitocondrie (schemă modif. după date din literatură, preluată din 116). Sunt marcaţi (prin încadrare cu linie punctată) grupările cu atomii de azot care vor fi eliminaţi prin uree. NAG: N-acetil-glutamat; ATP: adenozintrifosfat; ADP: adenozindifosfat.

Enzimele şi sistemele de transport menţionate în reacţiile figurii sunt:
1 – NAGS - N-acetil glutamat sintetaza
2 – CPS I: Carbamoilfosfat sintetaza I
3 – OCT: Ornitincarbamil transferaza (numită şi ornitin transcarbamilaza)
4 – ASS: Argininsuccinat sintetaza
5 – ASL: Argininsuccinat liaza
6 – Arginaza
T1 – Sistem antiport ornitină-citrulină (deficient în sindromul HHH: *hiperornitinemie-hiperamoniemie-homocitrulinurie)*
T2 – Sistem antiport aspartat-glutamat (numit şi citrină), deficient în citrulinemia tip II.

Defectele genetice legate de ciclul ureei sunt printre cele mai frecvente defecte genetice de metabolism (având o incidenţă cumulativă de cca 1:8 000 nou-născuţi) şi se datorează unor deficienţe enzimatice (sau al unui transportor T1 al ornitinei din membrana mitocondrială, v. fig. alăturată) implicate în mod normal în funcţionarea ciclului ureei; cea mai frecventă dintre deficiențele din ciclul ureei este deficiența ornitintranscarbamilazei (OTC), adesea subdiagnosticată la sexul feminin. Ca urmare a hiperamoniemiei din defectele din cilul ureei, aceste anomalii sunt urmate de apariţia semnelor clinice de encefalopatie. ”Tabloul clinic poate fi manifest la orice vârstă (uneori pentru prima oară chiar la vârsta adultă), iar determinarea amoniemiei plasmatice trebuie să fie o investigaţie de bază pentru toţi pacienţii cu encefalopatie de cauză necunoscută, la orice vârstă. Cu toate acestea, există anumite perioade de timp când apariţia simptomelor este mai probabilă, fiind determinate de stresul metabolic cum este catabolismul proteic precipitat de infecţii:

- perioada neonatală (0-1 lună de viaţă);
- sfârşitul perioadei de sugar (înainte de vârsta de 1 an) când copiii sunt vulnerabili ca urmare a schimbării ratei de creştere (scăderea acesteia), a ablactării cu schimbarea tipului de alimentaţie (introducerea laptelui de

vacă), a apariţiei declinului titrului anticorpilor care provin de la mamă (şi având o sensibilitate mai mare la infecţii);

- în cursul pubertăţii (decompensările pot fi precipitate de schimbarea ratei de creştere şi de factori psiho-sociali).

Tulburările din ciclul ureei sunt caracterizate prin triada: ***hipermoniemie, encefalopatie*** *şi* ***alcaloză respiratorie****,* iar caracteristicile clinice generale sugestive pentru o anomalie din ciclul ureei au fost clasificate pe categorii de vârstă:

- Pentru *nou-născuţi*: apariţia de simptome rapid progresive care apar în primele zile de viaţă (după o scurtă perioadă fără manifestări de boală) cum sunt: letargia, problemele de alimentaţie, hiperventilaţia, crizele epileptice, encefalopatia progresivă cu comă profundă, instabilitatea termică, pierderea reflexelor, hemoragia intracerebrală (obiectivată prin examinări imagistice) şi explicată prin defecte de coagulare.

- Pentru *sugari, copii mici*: falimentul creşterii, probleme de alimentaţie, vărsături, simptome neurologice cronice, encefalopatie episodică cu letargie, ataxie, crize epileptice şi chiar comă.

- Pentru *adolescenţi şi adulţi*: simptome neurologice sau psihiatrice cronice, probleme de comportament, episoade de dezorientare, letargie, psihoze, encefalopatie recurentă asociate de obicei cu un aport proteic crescut, catabolism sau stres" (116).

Investigaţiile metabolice trebuie să includă analiza aminoacizilor plasmatici şi urinari, precum şi analiza acidului orotic urinar. Determinările de aminoacizi permit adesea încadrarea valorilor patologice obţinute în anumite defecte; o sinteză a acestor valori în raport cu cele de referinţă sunt utile în orientarea biochimică; se pot observa și comparațiile cu modificările limitate din zaharopinurie – o altă deficiență genetică de metabolism (valori exprimate în μmol/l, tabel preluat din date de literatură – Summar, *Urea cyle disorder overview* (online), sintetiză în vol R. Vulturar, M. Cucuianu 2011):

Amino-acizi	Deficiența CPS I	Deficiența OCT	Citrulinemia	Aciduria arginino-succinică	Aciduria glutarică tip II	Deficiența Piruvat carboxilazei (PC)	Zaharo-pinuria	Valori de referință
Tau	226 ± 25	154 ± 14	126 ± 13	316 ± 32	288	186 ± 20	—	124 ± 12
Asp	39 ± 4	41 ± 4	45 ± 5	76 ± 8	31	19 ± 2	—	35 ± 3
Thr	109 ± 12	243 ± 23	214 ± 23	346 ± 36	126	328 ± 33	—	217 ± 22
Glu	897 ± 91	1260 ± 132	468 ± 47	801 ± 82	153	53 ± 5	—	62 ± 6
Cit	urme	urme	2232 ± 231	120 ± 13	75	216 ± 23	80	21 ± 3
Pro	1722 ± 182	437 ± 46	560 ± 57	998 ± 100	1890	981 ± 99	—	185 ± 20
Ala	1825 ± 201	1219 ± 123	1248 ± 125	1585 ± 160	306	646 ± 65	—	235 ± 24
Val	126 ± 13	132 ± 13	158 ± 22	216 ± 22	117	203 ± 20	—	137 ± 14
Ile	56 ± 6	79 ± 7	53 ± 5	92 ± 10	37	99 ± 10	—	40 ± 5
Leu	121 ± 9	98 ± 9	115 ± 12	178 ± 18	73	153 ± 15	—	72 ± 7
Orn	56 ± 5	65 ± 7	59 ± 6	61 ± 6	108	75 ± 8	—	92 ± 9
Lys	712 ± 80	827 ± 86	664 ± 67	688 ± 71	630	746 ± 75	607	200 ± 21
Arg	29 ± 2	31 ± 3	37 ± 3	38 ± 4	31	59 ± 6	—	64 ± 7

Tratamentul trebuie instituit rapid şi este necesar să includă scăderea aportului proteic, precum şi suplimentarea cu aminoacizii esenţiali; de asemenea se evită stările de catabolism proteic, şi se administrează săruri de sodiu (benzoat de sodiu, fenilacetat/fenilbutirat de sodiu) care îndepărtează amoniacul ca preparate conjugate alternative cum sunt glicina şi glutamina (102, 123).

IV.4. Bolile lisosomale

Lisosomii sunt organitele intracelulare ale digestiei, având o memebrană simplă care împiedică eliberarea enzimelor sale digestive în citosol. Aceste enzime sunt esențiale pentru o mare varietate de funcții ale celulelor care implică îndepărtarea resturilor celulare și reciclarea componentelor acestora, inclusiv distrugerea microorganismelor (bacterii, drojdii etc), remodelarea țesuturilor, involuția unor țesuturi în timpul dezvoltării și înnoirea fiziologică a unor organite celulare sau chiar celule (2).

Enzimele lisosomale includ nucleaze, fosfataze, esteraze, proteaze numite catepsine ș.a. Aceste enzime sunt toate hidrolaze, enzime care scindează gruparea de tip amidă, ester și alte legături prin utilizarea apei. Majoritatea acestor hidrolaze lisosomale au cea mai mare activitate la pH-ul optim de 5,5. PH-ul intra-lisosmal se menține aproape de 5,5 în principal prin activitatea unor pompe aflate în membranele acestor organite sau vezicule de tip endosomi care participă la biogeneza lor (ATP-aze veziculare); aceste sisteme transmembranare pompează activ protoni în interiorul lisosomilor. Citosolul și alte compartimente intra celulare au un pH mai apropiat de 7,2 și sunt, prin urmare, protejate de activitatea hidrolazelor lisosomale care pot ajunge accidental în citoplasmă (1, 2).

Mulți dintre produșii digestiei lisosomale, cum sunt aminoacizii după degradarea intracelulară a peptidelor și proteinelor, revin în citosol. Prin urmare, lisosomii sunt implicați în reciclarea compușilor. Biogeneza lisosomilor presupune participarea reticulului endoplasmic rugos unde are loc sinteza lanțurilor polipeptidice care vor deveni enzimele lisosomale; la nivelul complexului Golgi, enzimele sunt 'marcate' pentru endosomi (și în cele din urmă vor intra în constituția lisosomilor primari) prin adăugarea de grupări de tip de manoză 6-fosfat care vor fi apoi molecule semnal recunoscute de receptorii pentru manoză 6-fosfat. Astfel, veziculele care conțin receptorii pentru manoză 6-fosfat împreună cu hidrolazele lor acide atașate vor fi încorporate în vezicule imbrăcate cu clatrină. Veziculele de transport vor pierde ulterior clatrina și vor fuziona cu membrana endosomului tardiv. Aciditatea conferită prin pompa de protoni (ATP-aza adusă în membrana

endosomului) eliberează hidrolazele acide din legătura cu receptorii acestor grupări în lumenul veziculei. Receptorii sunt reciclați în cele din urmă în complexul Golgi (2, 108).

Bolile genetice lisosomale sunt anomalii care aparțin tulburărilor de catabolism al moleculelor complexe, și se datorează unor defecte genetice care afectează o anumită hidrolază acidă prezentă în mod normal în lisosomii primari. Catabolismul lipidelor complexe sau a mucopolizaharidelor este dependent de aceste enzime, iar deficienţa unei enzime din lisosomi determină acumularea substratului caracteristic acestei enzime, cu afectarea structurii şi funcţiei mai multor organe. În cazul în care deficiența genetică afectează procesul de glicozilare corectă prin care se atașează gruparea manoză-6-fosfat, enzimele lisosomale sunt secretate înafara celulei, și sunt mai multe categorii de molecule-substrat care se acumulează în lipsa digestiei intralisosomale (bolile se numesc mucolipidoze și clinic asociază elemente ale mucopolizaharidozelor cu cele ale sfingolipidozelor) (62, 102, 123).

Astfel, tabloul clinic este caracterizat de o deteriorare neurologică progresivă, dismorfism şi organomegalie; fără a se observa episoade de decompensare acută; uneori durerile intense sunt cele care pot marca tabloul clinic. Investigaţiile includ examinări radiologice de evidenţiere a disostozelor scheletice multiple, analiza leucocitelor şi a altor celule pentru imagini caracteristice. Diagnosticul de laborator se poate orienta prin analiza urinară a glucozaminolicanilor şi oligozaharidelor, iar studiul enzimatic, respectiv molecular, confirmă diagnosticul. Terapia enzimatică de substituţie este disponibilă pentru o parte dintre aceste anomalii; în plus, transplantul medular s-a demonstrat a fi eficient doar în anumite defecte ale acestei categorii de boli (123). Categorii de boli lisosomale (108, 120, 123):

1) *Mucopolizaharidozele* (MPZ) sunt macate prin dezvoltarea progresivă a unor caracteristici dismorfice, hepatomegalie şi retard (sau regres) psihomotor. Aceste anomalii sunt de obicei recunoscute prin analiza urinară a glicozaminoglicanilor.
2) *Oligozaharidozele* sunt anomalii genetice similare MPZ, dar multe pot fi marcate de un tablou clinic neurologic mai sever, şi fiind mai frecvent simptomatice la naştere (hidrops fetal nonimun). Diagnosticul este posibil prin analiza oligozaharidelor urinare sau prin studii enzimatice.
3) *Sfingolipidozele şi bolile de stocare ale lipidelor* se manifestă prin deteriorare neurologică progresivă. Se mai poate asocia hepatomegalia, iar deformările scheletice, sau caracteristicile dismorfice sunt rare. Alte manifestări particulare s-au înregistrat în boala Fabry (dureri, parestezii), precum şi în

forma non-neuropată a bolii Gaucher (manifestată prin anemie, hematoame, splenomegalie marcată, durerei abdominale şi osoase). Diagnosticul specific necesită studiu enzimatic. Lipofuscinoza neuronală ceroidă este de obicei suspectată după analiza electronomicroscopică a celulelor cutanate (sau limfocitare), dar confirmată prin analiza moleculară. Mucolipidozele combină caracteristicile clinice ale MPZ cu cele ale sfingolipidozelor şi pot reflecta deficienţe enzimatice lisosomale multiple, ca urmare a sintezei deficitare a enzimelor lisosomale.

4) *Defectele transportului lisosomal* includ cistinoza şi boala de stocare a acidului sialic, ambele fiind cauzate de un transport membranar deficitar dinspre lisosomi spre citosol. Pentru cistinoză (boală marcată de nefropatie, disfuncţii ale altor organe cum sunt glanda tiroidă, ochii) diagnosticul de certitudine se pune prin studiul conţinutului leucocitar în cistină, iar terapia se poate face cu cisteamină sau, când este disponibil, prin transplant renal.

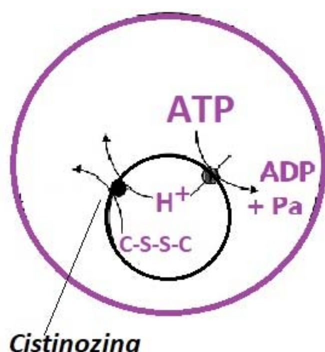


Fig. 34. Schema poziționării transportorului (notat şi cistinozină) de la nivelul membranei lisosomale care este afectat în cistinoză; C-S-S-C reprezintă o moleculă de cistină formată din 2 molecule de cisteină (legate prin punte disulfidică;

În imagine este reprezentată şi pompa de protoni din membrana lisosomală (schemă după date din literatură – sinteză în 116).

În plus, boala de stocare a acidului sialic determină encefaloneuropatie progresivă şi se diagnostichează prin identificarea concentraţiei crescute de acid sialic în urină (9, 123).

IV.5. Bolile peroxisomale

Rolurile biochimice ale peroxisomilor sunt foarte diverse, includ atât procese oxidative, cât și procese biosintetice (rol în sinteza plasmalogenilor) (1, 2).

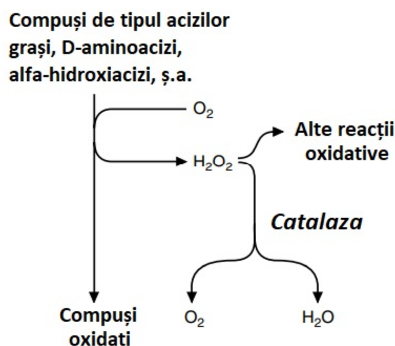


Fig. 35. Reprezentarea simplă a reacțiilor din peroxisomi (cu formarea apei oxigenate care va fi preluată de catalază – enzimă cu rol în detoxificare (dupa 123) .

Peroxisomii consumă o mare parte din oxigenul celulei (aproximativ 10% din reacțiile folosite de ficat). Astfel, deficienţa totală sau parţială a enzimelor peroxisomale poate determina boli severe, progresive şi multisistemice, cu afectarea sistemului nervos central. În acest sens s-au identificat (102, 123):

1) *Defecte de biogeneză a peroxisomilor* sau *defecte de activare şi β-oxidare a acizilor graşi cu lanţ lung de atomi de carbon* şi sunt anomalii care evoluează clinic prin boală neurologică progresivă, anomalii structurale (cum e cazul Sindromului Zellweger – hepatocerebrorenal), şi anomalii funcţionale hepatice, intestinale şi ale glandei suprarenale. Aceste boli sunt foarte severe, nu beneficiază de metode terapeutice, şi pot fi recunoscute prin analiza acizilor graşi cu lanţ de atomi de carbon foarte lung în probe de sânge sau în fibroblaste.
2) *Boala Refsum* este un defect în metabolismul acidului fitanic de origine exogenă; clinic boala se caracterizează prin anomalii progresive lente (adesea manifeste doar la vârsta adultă) ale sistemului nervos, auzului sau văzului. Diagnosticul este posibil prin dozarea acidului fitanic, iar terapia se face prin restricţia aportului alimentar cu acid fitanic.
3) *Defecte ale biosintezei eter-fosfolipidelor (plasmalogenilor)* determină apariţia bolii numite condrodisplazia rizomielică punctata marcată de anomalii ale lungimii fragmentelor proximale ale membrelor şi manifestări neurologice. Diagnosticul se face prin dozarea plasmalogenilor în eritrocite; nu s-au descris metode terapeutice eficiente în aceste anomalii.

4) *Deficienţa catalazei* este singura anomalie genetică implicată în afectarea îndepărtării radicalilor liberi ai oxigenului. Boala se manifestă prin apariţia de ulceraţii cronice la nivelul mucoaselor cavitaţii bucale.
5) *Hiperoxaluria primară tip I* este singura anomalie cunoscută în metabolismul glioxilatului; tabloul clinic este caracterizat de nefrolitiază şi nefro-calcinoză, iar biochimic, boala se diagnostichează prin analiza acizilor organici urinari care permite dozarea oxalatului şi glioxilatului. Terapia actuală cuprinde transplantul hepatic şi renal.

IV.6. Anomaliile metabolismului izoprenoizilor şi sterolilor

Aceste anomalii afectează componente biochimice importante în diverse procese celulare şi legate de dezvoltare. Cea mai mare parte a defectelor de biosinteză sunt determinate de deficiențe enzimatice care sunt localizate în partea proximală a căii metabolice (123):

1) *Deficienţa mevalonat kinazei* este identificabilă în cursul copilăriei prin dismorfism, falimentul creşterii, retard mental şi crize febrile recurente. O formă mai uşoară a aceleiaşi deficiențe se cunoaşte ca „*sindromul hiper IgD*”. Terapia este simptomatică.
2) *Defecte ale biosintezei sterolului* determină anomalii structurale care asociază trăsături dismorfice de tipul sindromului Smith-Lemli-Opitz, pentru care terapia prin suplimentarea cu colesterol are o eficiență limitată.

IV.7. Defectele congenitale de glicozilare (*Congenital Disorders of Glycosylation – CDG syndromes*)

Modificările post-translaționale se referă la prelucrări biochimice care au loc imediat după sinteza unui lanț polipeptidic; aceste reacții pot fi de acetilare, hidroxilare, metilare, fosforilare, carboxilare ș.a. Una dintre cele mai importante tipuri de reacție post-translațională este glicozilarea, adică adăugarea grupărilor de carbohidrați, și este o reacție comună care apare în principal pe proteinele care sunt destinate să fie secretate sau încorporate în lisosomi sau în membranele celulare (2, 108).

Defectele congenitale de glicozilare se referă la procesele care au loc în mod normal în reticulul endoplasmic, aparatul Golgi sau în citosol şi care asigură formarea glicoproteinelor respectiv glicolipidelor funcţionale ca urmare a glicozilării (adaosul de grupări oligo- sau poli- zaharidic). Studiile biochimice au arătat că toate enzimele proteinelor transportor, precum și cele membranare

suferă procesul de glicozilare care sunt procese enzimatice, iar defectele survenite în aceste procese au fost cuprinse cu termenul *CDG-syndromes*. Sunt incluse de asemenea modificările de sinteză a proteoglicanilor din matricea extracelulară. Există zeci de tipuri de enzime cunoscute astăzi ca fiind implicate în diverse etape de glicozilare, iar deficienţa unei singure astfel de enzime determină un spectru larg de anomalii structurale şi funcţionale. Numărul de boli congenitale de glicozilare identificate în ultimii ani a crescut exponențial. Literatura de specialitate nu este de acord asupra numărului exact de tipuri CDG, este apreciat ca fiind mai mare de 100 de tipuri (77, 102).

Suspiciunea unui astfel de deficienţe trebuie ridicată pentru orice pacient cu o boală multisistemică neidentificată sau cu o anomalie neurologică. Perturbarea glicozilării de tip N (care transferă grupări glicozil pe asparagina unui lanţ polipeptidic) este cel mai adesea identificată prin electroforeza de tip focusare izoelectrică a transferinelor din ser; exisă și alte metode de identificare a unor astfel de defecte, cromatografia lichide de înaltă performanţă (HPLC) sau a specrometriei de masă (MS) pentru testarea glicoformelor transferinelor serice. Din păcate, doar o mică parte dintre aceste boli pot beneficia la ora actuală de o terapie care ameliorează tabloul clinic (123).

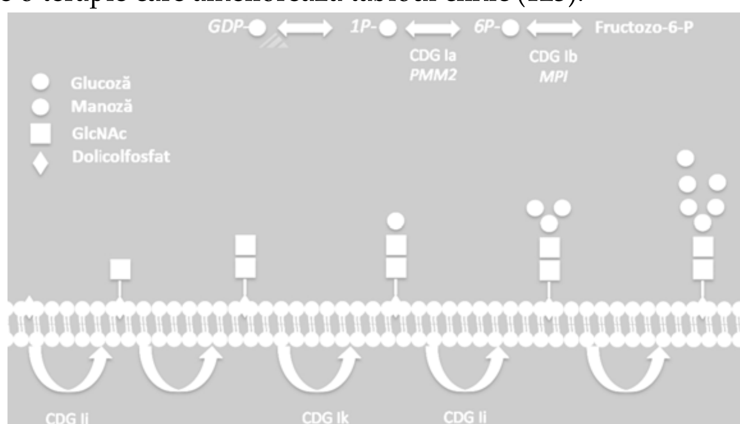


Fig. 36. Reprezentarea primelor etape biochimice de glicozilare la nivelul membranei reticulului endoplasmic. Dolicolfosfatul servește ca ancoră legată de membrană pentru construcția glicanilor.

Enzimele implicate în tulburările congenitale ale glicozilării de tip I (CDG I) sunt implicate în aceste etape timpurii ale biogenezei glicanului; de exemplu, sinteza DPAGT1 - cu participarea enzimei Dolicil-fosfatN-acetilglucozamin-fosfo transferaza 1 - care, dacă este deficitară va produce sindromul notat CDG Ij (2, 123).

Experiența centrelor specializate în aceste patologii au arătat că aceste tipuri de defecte (*tulburări congenitale ale glicozilării - CDG*) ar trebui luate în considerare în orice stare clinică inexplicabilă, în special în bolile care afectează mai multe organe (implicând afectarea neurologică) dar și atunci când se constată o întârziere nespecifică de dezvoltare (102, 123).

Se știe că legat de glicozilarea proteinelor există N- glicozilare (la nivelul asparaginei din lanțul polupeptidic) , respectiv O –glicozilare (la nivelul grupării hidroxil a treoninei sau serinei din lanțul polipeptidic).

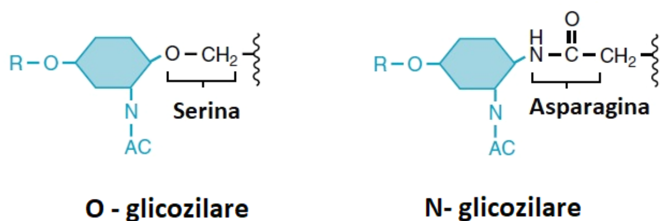


Fig. 37. Glicozilarea proteinelor- prin adăugarea de structuri glucidice la un anumit aminoacid din lanțul polipeptidic (N- sau O- glicozilare) (modificat după 108).

Multe categorii de sindroame CDG interferează cu neurodezvoltarea încă din viața fetală, în special procesele de O-glicozilare proteică și lipidică. Afectarea cerebelului și atrofia olivopontocerebeloasă sunt frecvente în multe defecte de tipul N-glicozilării proteice. Testele de tip secvențierea exomului (WES) sau a genomului (WGS) sunt din ce în ce mai utilizate în diagnosticul pacienților cu tablou sugestiv al unui sindrom CDG, fără încadrarea certă a subtipului (în acest caz notându-se CDG-X) (102, 123).

IV.8. Tulburări genetice în transportul sau utilizarea cuprului, fierului sau zincului

1) *Defectele metabolismului cuprului* se diagnostichează prin analiza cuprului şi ceruloplasminei în ser, urină şi ţesut hepatic. Boala Wilson (numită și degenerescență hepatolenticulară) determină apariția unei hepatopatii cronice (frecvent apărute între 6-18 ani) asociate unor disfuncţii ale sistemului nervos central- cum sunt disartria, tulburările de coordonare motorie, chiar până la paralizie bulbară; aceste modificări neurologice au fost mai frecvent identificate la vârste de 20-40 de ani) (123).

Boala Menkes se caracterizează prin transportul deficitar al cuprului și este o tulburare neurodegenerativă (care asociază și anomalii osoase, ale părului şi ţesutului conjunctiv), iar transmiterea este legată de cromosomul X. Consecințele defectului genic sunt legate de disfuncțiile secundare ale unui număr de enzime dependente de cupru, inclusiv a enzimei dopamin beta hidroxilaza (DBH). Profilul neurotransmițătorilor evaluați în l.c.r. este similar cu cel din deficitul primar de DBH, iar diagnosticul se confirmă prin dozările de cupru (68, 102).

Terapia bolii Wilson se adresează reducerii încărcării cu cupru, în timp ce în boala Menkes cuprul trebuie administrat parenteral. Aceruloplasminemia este o deficienţă a ceruloplasminei asociată unor concentraţii scăzute de cupru şi fier, iar terapia se face prin administrarea intravenoasă a preparatelor cu ceruloplasmină (102, 123).

2) *Defectectele din metabolismul fierului* se manifestă prin anemie feriprivă (dată de absorbţia intestinală deficitară a fierului) sau prin manifestări de încărcare hepatică cu fier (de ex. în hemocromatoză). Încărcarea secundară cu fier poate apărea în anumite anemii hemolitice (caracterizate prin distrucţii eritrocitare marcate). Terapia se face prin administrarea preparatelor cu fier (în cazul anemiei feriprive) sau, în cazul anomaliilor care evoluează cu încărcare cu fier se indică flebotomie şi administrare de preparate de îndepărtare a fierului (ex. deferoxamina) (102).

3) *Defecte ale metabolismului zincului* (cum este acrodermatita enteropatică) se manifestă prin manifestări cutanate cronice, alopecie şi manifestări ale sistemului nervos central. Diagnosticul de laborator se face prin dozarea fosfatazei alcaline, respectiv a zincului (ambele având în aceste cazuri valori scăzute); terapia se face prin suplimentarea cu preparate cu zinc (102).

IV.9. Tulburări în metabolismul energetic (anomaliile mitocondriale sau mitocondriopatiile)

Toate procesele active din celulele vii necesită transformarea energiei. Celulele transformă energia legăturilor chimice din alimente în alte forme, cum ar fi menținerea unui gradient electrochimic pentru membrana plasmatică, repolarizarea membranei neuronilor după transmiterea impulsurilor nervoase, contracția fibrelor musculare din musculatura scheletică de la nivelul membrelor, ori sinteza unor molecule cum sunt, de exemplu proteineșe, moleculele de ADN ș.a. Aceste transformări energetice pot fi incluse în trei faze principale (1, 2):

(1) degradarea produșilor din alimente (grăsimi, carbohidrați, și proteine,

2) conversia energiei din oxidarea alimentelor (incluzând și ciclul acizilor tricarboxilici – CAT, respectiv fosforilarea oxidativă din mitocondrii) în energie superioară – care va fi înmagazinată în legăturile fosfat din molecula de ATP ,

(3) utilizarea energiei din legăturile fosfat ale ATP-ului pentru a realiza procesele active care necesită energie.

Primele două faze ale transformării energiei fac parte din respirația celulară, proces general de utilizare a oxigenului și a energiei derivate din combustibili oxidați, pentru a genera molecule de adenozintrifosfat (ATP). Celulele noastre necesită oxigen pentru a genera adecvat cantități de ATP de la oxidarea substratelor alimentare până la dioxid de carbon (CO_2). Utilizăm în cursul proceselor de respirație celulară realizată în mitocondrii prin participarea complexelor localizate în membrana internă mitocondrială (*formând lanțul respirator mitocondrial*) peste 90% din oxigenul pe care îl inhalăm (2, 108).

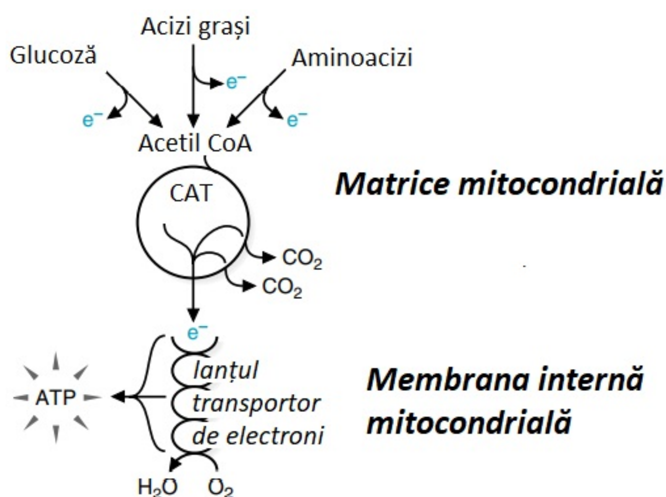


Fig. 38. Reprezentarea generală a reacțiilor de degradare biochimică având cele trei tipuri de substrat (glucidic, lipidic și proteic) (schemă modif. după 108)
CAT: ciclul acizilor tricarboxilici, ATP: adenozin trifosfat

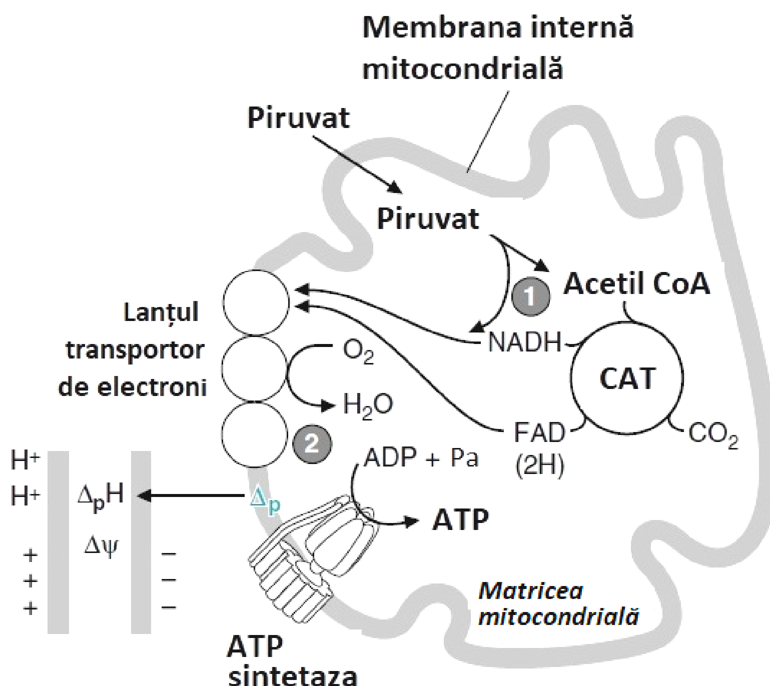


Fig. 39. Reprezentare generală a transformărilor energetice în cursul fosforilarii oxidative. Gradientul electrochimic la nivelul membranei interne mitocondriale este reprezentat de diferența de pH (ΔpH), gradientul de protoni și potențialul membranei (schemă modif. după Marks 2004), CAT: Ciclul acizilor tricarboxilici, NADH: nicotinamid adenin dinucleotid-forma redusă, FAD(2H): flavin adenin dinucleotid - forma redusă, Pa- fosfat anorganic.

Disfuncții ale mitocondriilor date de mutații în ADN-ul mitocondrial sau ADN-ul nuclear care codifică anumite subunități ale complexelor respiratorii mitocondriale vor determina generarea deficitară de ATP din metabolismul oxidativ; țesuturile cele mai afectate sunt cele musculare și sistemul nervos, pacienții fiind diagnosticați cu miopatii, encefalomiopatii (2, 26).

Anomaliile din metabolismul energetic se referă la deficiențele genetice ale complexului piruvat dehidrogenazei (PDHC), a piruvat carboxilazei (PC), deficiențe din ciclul Krebs sau ale complexelor lanțului transportor de electroni localizat în membrana internă mitocondrială; acestea corespund etapelor finale de catabolism al diverselor tipuri de substrate, finalizat cu producția de ATP (26, 123).

Mitocondriile asigură prin multiplele lor funcții atât generarea moleculelor de ATP, menține homeostazia intracelulară a calciului, intervin în reglarea

morții celulare programate (apoptoză); astfel, aceste organite citoplasmatice conțin un număr mare de enzime și complexe enzimatice, unele conținând peste 50 de tipuri de proteine diferite. Moleculele de NADH provin în principal din oxidarea acizilor grași și ciclul acizilor tricarboxilici (CAT sau ciclul Krebs) și este oxidat de complexul I, în timp ce moleculele $FADH_2$ sunt generate de asemenea din oxidarea acizilor grași și ciclul acizilor tricarboxilici (CAT sau ciclul Krebs), dar este oxidat de complexul II al lanțului transportor de electroni. Reacțiile redox de la nivelul complexelor I, III, IV generează un important gradient de protoni care va sta la baza energiei mecanice (a protonilor care pătrund prin complexul V) utilizate pentru sinteza moleculelor de ATP, oxigenul fiind ultimul acceptor de electroni (2, 123).

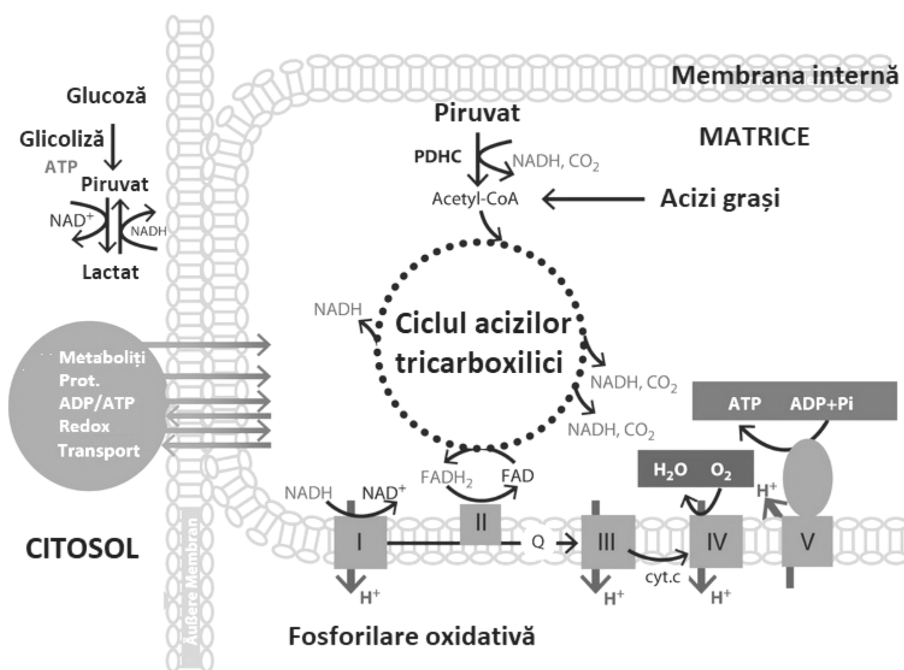


Fig. 40. Reprezentarea schematică a reacțiilor principale din matricea mitocondrială care va furniza substrate pentru oxidarea finală prin transferul electronilor în lanțul respirator mitocondrial- format din complexe proteice incluse în membrana internă a mitocondriilor (schemă modif. după date din literatură -2, 123); ATP: adenozintrifosaft, ADP: adenozindifosfat; $FADH_2$: flavin adenin dinucleotid forma redusă, NADH: Nicotinamid-adenin dinucleotid, forma redusă.

Tabel X. Reprezentarea numărului subunităților complexelor din lanțul respirator mitocondrial, codificate de ADN nuclear, respectiv mitocondrial (123):

Tipul de ADN afectat	Complex-ul I	Complex -ul II	Complex-ul III	Complex -ul IV	Complex ul V
ADN mt (mitocondrial)	7 subunit.		1 subunit.	3 subunit.	2 subunit.
ADNn (ADN nuclear)	38 subunit.	4 subunit.	10 subunit.	11 subunit.	14 subunit.

Deficiențele proteinelor complexelor din lanțul transportor de electroni care realizează fosforilarea oxidativă (OXPHOS) sunt cele mai severe defecte și dificil de tratat (acestea includ defectele legate de cele 4 complexe ale lanțului respirator plus complexul V sau ATP sintetaza). Cele 289 de gene cunoscute ca fiind implicate în bolile mitocondriale pot fi împărțite în cele care au un rol primar specific în biogeneza OXPHOS, și cele al căror impact asupra OXPHOS este indirect sau implică alte funcții celulare. Pe baza funcției lor, proteinele codificate pot fi grupate în (26, 123):

a. Subunități ale complexelor OXPHOS, factori implicați în asamblare sau transportori de electroni
b. Proteine implicate în menținerea ADN mitocondrial
c. Proteine implicate în expresia ADN mitocondrial
d. Cofactori enzimatici
e. Proteine implicate în homeostazia și verificare
f. Proteine implicate în metabolismul general.

Manifestările cerebrale ale bolilor mitocondriale sunt foarte frecvente și acoperă o mare varietate de caracteristici clinice (care pot fi timpurii - postnatale, până la perioada de adult - cu debut tardiv). Aceste manifestări pot fi: convulsii, encefalopatie, ataxie, de tip accident vascular cerebral, întârziere în dezvoltare și / sau regresie, declin cognitiv. Deteriorarea tabloului clinic poate fi accentuată de perioade de stres metabolic (infecţii). S-a arătat că defectele de oxidare aerobă a glucozei (consecințe ale disfuncției mitocondriale) se manifestă prin acidemii lactice congenitale și pot prezenta chiar și manifestări prenatale, cum sunt: disgenezie cerebrală, atrofie a corpului calos, microcefalie ș.a. Majoritatea acestor

defecte mitocondriale au o evoluție progresivă. În plus, unii pacienți cu forme severe de boală pot prezenta anomalii congenitale de tipul rinichiului polichistic, defecte în migrarea neuronală care pot fi detectate prenatal prin RMN fetal și analiza morfofetală se care poate identifica un anumit dismorfism facial (102, 123).

Funcționarea normală a mitocondriilor depinde și de transportul unor ioni la nivelul membranei interne mitocondriale; piruvat carboxilaza (PC) îndeplinește un rol anaplerotic pentru sinteza aspartatului din acidul oxalo-acetic, iar defectele genetice care afectează această anzimă (PC) pot avea forme severe cu afectarea gravă a sistemului nervos central (fenotipul B- "*Francez*") marcat de acidoză lactică congenitală, hipotonie, encefalopatie, convulsii, deces în primele săptămâni de viață. Fenotipul A de boală (numit și "*Nord-American*") este caracterizat de retard în dezvoltare, acidoză lactică și hipoglicemii moderate, iar fenotipul C ("*benign*") corespunde unor forme ușoare de boală, cu episoade de acidoză lactică și hipoglicemie și dezvoltare neurologică normală (2, 123).

Reprezentarea etapelor metabolice care afectează funcționarea reacțiilor din matricea mitocondrială:

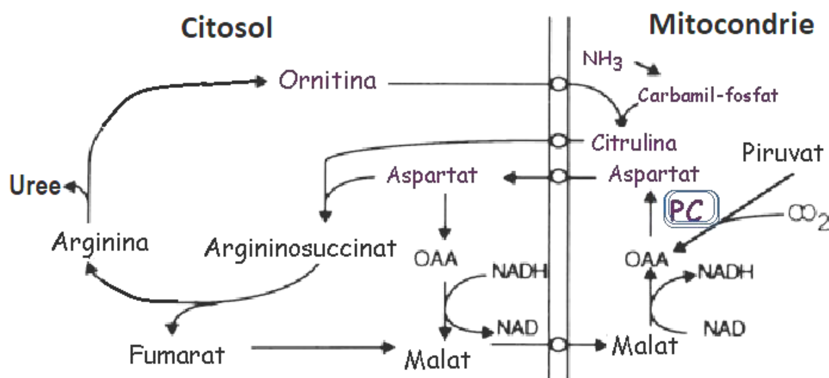


Fig. 41. Rolul anaplerotic al piruvat carboxilazei (PC) în generarea aspartatului care intră în ciclul ureei şi participă la re-oxidarea NADH (schemă concepută după date din literatură, preluată din 115); OAA: Acidul oxalo-acetic, NAD: Nicotinamid-adenin dinucleotid, NADH: Nicotinamid-adenin dinucleotid, forma redusă, NH_3: amoniac.

Diagnosticul de laborator include mai multe etape, cele din prima etapă de analiză fiind: dozarea acidului lactic în sânge, l.c.r., analiza aminoacizilor

plasmatici. Pentru studiul activității unor complexe mitocondriale s-au încercat mai multe metode. Multe dintre tehnicile de analiză a structurilor proteice dezvoltate în a 2-a jumătate a secolului XX și aplicate pentru membranele biologice (de ex. BN-PAGE: *Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis)* au permis studiul avansat al variantelor normale și patologice ale complexelor care formează lanțul respirator mitocondrial (chiar cu identificarea activității catalitice prin metode de colorare histochimică); sunt posibile studiile amănunțite (privind subunitățile complexelor, particularități de asamblare etc) în probe bioptice cum sunt mușchiul scheletici, culturi de fibroblaste, probe hepatice sau chiar miocard- colectate conform tabloului clinic al fiecărui pacient. Defectele identificate au fost legate de mutații ale ADN din nucleu sau din mitocondrii implicate în codificarea complexelor mitocondriale. De asemenea, esenţiale diagnosticului corect este monitorizarea disfuncţiilor tisulare şi investigaţiile imagistice (26, 67, 123).

Opţiunile terapeutice sunt foarte limitate, şi include administrarea unor vitamine şi cofactori cum sunt riboflavina, coenzima Q, sau tiamina (123).

IV.10. Defecte genetice legate de transportul intracelular neuronal afectând veziculele presinaptice

O particularitate a transmiterii prin mediatori chimici constă din recaptare, un proces dependent de energie prin care neuronii reuşesc să-şi conserve moleculele proprii de neurotransmiţători, preluându-i din fanta sinaptică şi stocându-i în vederea unei reciclări. Există receptori în membrana neuronilor presinaptici care au o funcţie foarte importantă legată de recaptarea unui anumit neurotransmiţător, servind ca ţinte terapeutice pentru mai multe clase de preparate farmacologice (99, 100).

Anomaliile monogenice legate de transportul intracelular neuronal afectând veziculele presinaptice sunt mai recent identificate și pot fi legate de diverse compartimente din neuroni. Astfel, reprezentarea schematică sintetizează regiunile incluse în aceste defecte: regiunile ce țin de secreția celu- lară (incluzând transportul veziculelor de la nielul complexului Golgi (cu regiunile sale cis, trans), transportul axoplasmic realizat în interiorul axonului neuronilor, din veziculele de stocare și eliberare a neurotransmițătorilor în fanta sinaptică. Astăzi de cunosc peste 360 de astfel de defecte monogenice, peste 80% dintre acestea având simptome neurologice (19, 20).

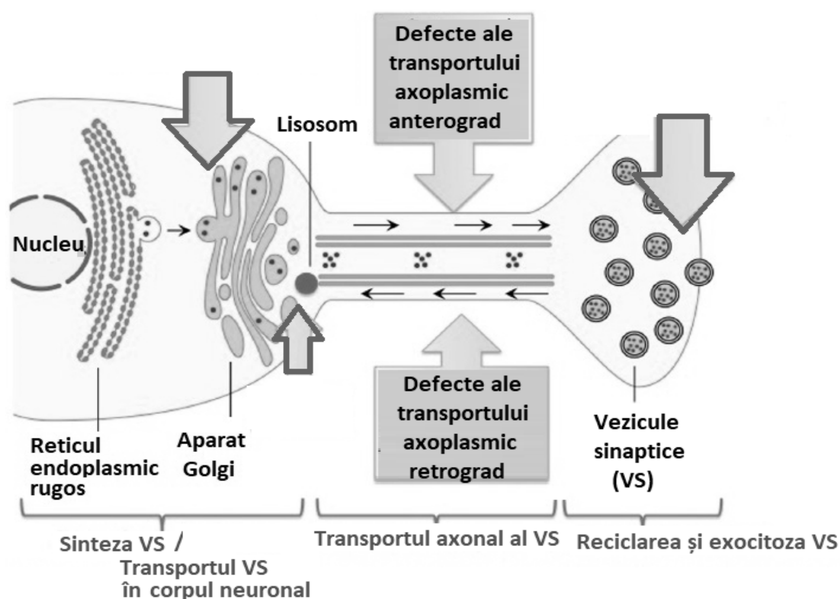


Fig. 42. Reprezentarea schematică a regiunilor din nouronul presinaptic pentru care s-au identificat defecte genetice legate de neurobiologia veziculelor sinaptice (VS) (modif. după date din literatură- 19, 20, 34)

Aceste boli sunt recent clasificate în funcție de etapa afectată din cursul formării veziculelor sinaptice (VS) astfel (34, 100):
(1) defecte de biogeneză a precursorilor veziculelor în corpul neuronal;
(2) defecte în transportul axoplasmic (în lungul axonului);
(3) defecte legate de circuitul veziculelor cu neurotransmițător în terminalul presinaptic (ciclul exocitoză-endocitoză, având ca scop principal eliberarea neurotransmițătorului în fanta sinaptică).

VS sunt structuri cu membrană, și s-a realizat identificarea legăturilor dintre procesele biologice perturbate de mutațiile genetice și tabloul clinic al acestor tulburări. Marea majoritate a defectelor încadrate în aceste boli se pot prezenta ca encefalopatii epileptice, cu afectarea dezvoltării intelectuale, la care se poate asociat și o tulburare din spectrul autist, precum și tulburări de mișcare (hipo- sau hiper- kinezie). Aceste simptome se pot suprapune și prezenta la pacienți ca o combinație de semne clinice care corespund spectrului *sinaptopatiilor*, patologie pentru care este deja descris un tablou clinic de tip continuum cu semnele enumerate anterior. Un număr mic de boli pot prezenta, de asemenea, semne neuromusculare (19, 34) .

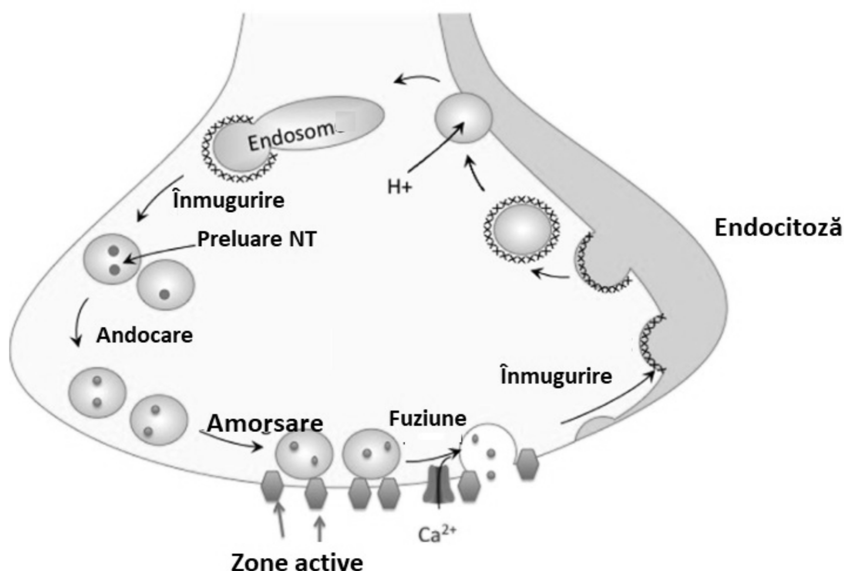


Fig. 43. Ciclul de viață al veziculelor sinaptice. SV vor îngloba molecule de neurotransmițător în apropierea zonei active. Unele vezicule sunt recrutat în zonele active într-un proces numit andocare. Aceste vezicule sunt apoi amorsate pentru eliberarea conținutului lor, iar calciul intracelular care crește ca urmare a potențialului de acțiune determină deschiderea printr-un por de fuziune la nivelul membranei celulare (schemă modif. după 19).

NT este eliberat în fanta sinaptică, iar vexicula poate fi recuperată și întoarsă în regiunea inițială prin 3 mecanisme:
(1) o reînchidere directă a porilor de fuziune și reformarea veziculei (mecanismul *„sărută și fugi"*),
(2) prin fuziune completă urmată de endocitoza mediată (cu participarea clatrinei), îndepărtarea învelișului de clatrină cu întoarcerea veziculei în zona inițială,
și
(3) prin fuziune completă și reciclare ca în cea de-a doua cale, dar vezicula de endocitată fuzionează mai întâi cu un endosom și veziculele mature se formează ulterior prin înmugurire din endosom (19).

În general, defectele genetice privind neurobiologia VS tind să fie encefalopatii cu debut timpuriu, care interferează sever cu neurodezvoltarea. În consecință, întârzierea dezvoltării asociată cu dizabilitatea intelectuală sunt prezente în aproape toate defectele descrise. Ținând cont de faptul că unele dintre aceste boli ar putea imita alte afecțiuni neurometabolice (și în special

tulburările tratabile), se impune inițial testarea metabolică extinsă prin analiza de biomarkeri urinari, plasmatici și în l.c.r. Progresele evidente privind genetica moleculară, cunoștințele recente despre mecanismele fiziopatologice și biomarkerii disponibili pentru diagnostic, precum și descrierile noilor tulburări presinaptice, vor aduce un beneficiu important în diagnosticul și potențialul terapeutic al acestor boli (19, 20, 100, 102).

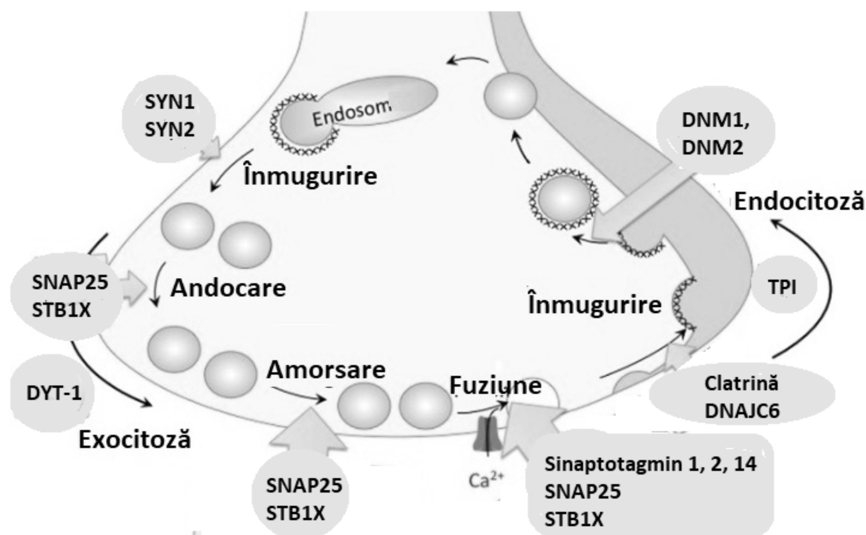


Fig. 44. Localizarea unor defectelor identificate în circuitul veziculelor de secreție la nivelul extremității neuronale (modif. după 19).

Tabel XI. Caracteristici privind transmiterea genetică, respectiv date clinice ale unor defecte din circuitul veziculelor de secreție ale neuronului presinaptic (19, 20):

	Defectul genic	**Transmitere genetică**	**Caracteristici clinice**
1.	DNAJC6	Autosomal recesivă	Parkinsonism cu debut timpuriu, cu răspuns pozitiv la administrarea de L-Dopa
2.	DNM1 (dinamin 1)	Autosomal dominantă	Encefalopatie epiletică cu debut timpuriu, sindrom Lennox-Gastaut, West, hipotonie și dizab. intelectuală
3.	DYT1	Autosomal dominant	Distonie generalizată cu debut precoce
4.	Sinapto-tagmina 1		Distonie cu debut în copilărie și coree, dezvoltare motorie întârziată, dizab.

	Defectul genic	Transmitere genetică	Caracteristici clinice
			intelectuală profundă
5.	Sinapto-tagmina 2	Autosomal dominantă	Sindrom miastenic Lambert—Eaton și neuropatie motorie non-progresivă
6.	Sinapto-tagmina 14	Autosomal recesivă	Retard psihomotor cu debut în copilărie și ataxie spinocerebelară lent progresivă, atrofie cerebelară progresivă
7.	SNAP 25	Autosomal dominantă	Epilepsie timpurie și retard în dezvoltare, hipotonie; anumite polimorfisme în această genă au fost associate cu boli neuropsihice
8.	STXBP1	Autosomal dominantă	Epilepsie în forme multiple, tulburări de mișcare, tulburări din spectrul autist dizab. intelectuală non-sindromică
9.	STB1X	Autosomal recesivă	Convulsii în condiții febrile, cu /fără epilepsie
10.	SYN1	?	Gene responsabile pt. tulburări din spectrul autist, dizab. intelectuală, foarte probabil legate de epilepsie; aceste simptome aparțin spectrului neurologic al sinaptopatiilor
11.	SYN2	?	
12.	TPI	Autosomal recesivă	Anemie hemolitică, epilepsie, distonie, neuropatie axonală, retard psihomotor cauzate de endocitoză deficitară

Concepția generală a bolilor genetice de metabolism (BGM) s-a dezvotat în ultimii 5 ani la interfața dintre biochimia clasică și biologia celulară. Acumularea cunoștințelor de bază din neuroștiințe oferă date noi privind mecanismele moleculare recent identificate în defecte ale transportului veziculelor cu neurotransmițător. Astfel, s-a arătat că este necesară actualizării conceptului clasic de „erori înnăscute ale neurotransmiterii” care lua în considerare principalele defecte ale sintezei, catabolismului și transportul moleculelor mici de NT; vor fi deci incluse și defectele monogenice implicând veziculelor sinaptice (VS) și mai ales acele defecte afectând circuitul normal al VS, acestea modificând în final atât eliberarea, cât și ‘turnover’-ul neurotransmițătorilor. Cele mai comune manifestări clinice nespecifice din aceste boli includ epilepsia, dizabilitatea intelectuală, tulburările din spectrul autist și

tulburări de mișcare; toate aceste date clinice au fost încadrate într-un continuum cu cele din patologia sinaptopatiilor. În plus, în mod interesant, malformațiile cerebrale și procesele neurodegenerative sunt semne identificate în cadrul acestei patologii afectând VS. Metabolomica, proteomica, genomica, și alte tehnici similare vor furniza probabil biomarkeri specifici și vor contribui la identificarea de ținte terapeutice în acest tip de boli severe (19, 20, 102).

Genetica rămâne unul dintre cele mai fascinante domenii ale științelor contemporane. Descoperirile din acest domeniu s-au desfășurat într-un ritm rapid în special după cel de-al doilea război mondial; cunoștințele acumulate în ultimele decenii privind organizarea moleculară a cromatinei cu structura genelor, compactarea cromatinei în cromosomi în cursul diviziunii, particularitățile de structură și funcție a acizilor nucleici etc, stau la baza tehnicilor avansate introduse în biologia moleculară a acestor ani. În plus, descifrarea genomului uman, elaborarea metodelor de terapie genică, a metodelor eficiente de obținere a organismelor transgenice, a modelelor funcționale ale unor organe - așa numitele *"organoids"* - obținute pentru mai multe tipuri de organe, inclusiv pentru structuri cerebrale, sau chiar introducerea tehnicii de editare ADN (Crispr-Cas9) sunt apanajul geneticii moleculare care a modificat profund biologia și medicina contemporană (42, 56-59, 95, 113).

Astfel, genetica umană este în ultimii ani în foarte mare măsură în atenția specialiștilor din domeniul medical, atât în privința aspectelor practice legate de identificarea la nivel molecular a peste 7050 de maladii genetice (unele beneficiind de terapie specifică), cât și în dezvoltarea terapiilor moderne; nu în ultimul rând, genetica umană stă la baza abordărilor antropologice privind problemele conceptuale legate de specia umană (17, 18, 106).

V. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. ABELES R.H., FREY P.A., JENCKS W., Biochemistry, Jones & Bartlett Publishers, 1992, 662-669.
2. ALBERTS B., HOPKIN K., JOHNSON A., MORGAN D., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., Essential Cell Biology, 5th edition, W.W. Norton & Company 2019.
3. ANDREICA S., VULTURAR R., CHIȘ A., MIU A.C., The development of neonatal gut microbiota and its role in health and disease, Obstetrica și Ginecologia, 2018, LXVI: 59-65.
4. BAXTER P., Pyridoxine-dependent seizures: a clinical and biochemical conundrum, Biochim Biophys Acta. 2003; 1647(1-2):36-41.
5. BENDER DAVID, Introduction to Nutrition and Metabolism, ed. 3-a, Taylor & Francis Inc, 2002, pag. 1-14.
6. BIANCHI M.C., TOSETTI M., BATTINI R., Leuzzi V., ALESSANDRI M.G., CARDUCCI C., ANTONOZZI I.and CIONI G., Treatment Monitoring of Brain Creatine Deficiency Syndromes: A ^{1}H- and ^{31}P-MR Spectroscopy Study, American Journal of Neuroradiology 2007; 28 (3) 548-554.
7. BIGOS KL, HARIRI AR., Neuroimaging: technologies at the interface of genes, brain, and behavior, Neuroimaging Clin N Am. 2007, 17(4):459-67.
8. BLAU N., BONAFE L., BLASKOVICS M.E., Disorders of Phenylalanine and Tetrahydrobiopterin Metabolism în Blau N., Duran M., Blaskovics M.E., Gibson K.M. (Editori), în Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases, Ed. a 2-a, Springer 2003, pag. 89-106.
9. BLAU N., DIONISI VICI C., FERREIRA, C.R., VIANEY-SABAN, C., VAN KARNEBEEK, C.D.M., Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases, Springer 2021.
10. BLAU N., THÖNY B., COTTON R.G.H., HYLAND K., Disorders of Tetra-hydrobiopterin and Related Biogenic Amines, în Scriver C., Beaudet A., Sly W.S., Valle D., Stanbury J., (Editori) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, McGraw Hill, 2008, 1725-1777.
11. BLAU N, BÉLANGER-QUINTANA A, DEMIRKOL M, FEILLET F, GIOVANNINI M, MACDONALD A, TREFZ FK, VAN SPRONSEN FJ., Optimizing the use of sapropterin (BH_4) in the management of phenylketonuria, Mol Genet Metab. 2009 Apr; 96(4):158-63.

12. BREEDLOVE MARC, ROSENZWEIG MARK, WATSON NEIL, Motor Control and Plasticity în Biological Psychology, An Introduction to Behavioral, Cognitive and Clinical Neuroscience, ed. a 5-a, 2007, pag. 320-352.
13. BRENNENSTUHL H, JUNG-KLAWITTER S., ASSMANN B., OPLADEN T., Inherited Disorders of Neurotransmitters: Classification and Practical Approaches for Diagnosis and Treatment, Neuropediatrics 2019;50:2–14.
14. CLARCK W., GRUNSTEIN M., The role of Neurotransmitters in Human Behavior în The role of genes in human behavior. Are we hardwired?, Oxford University Press, 2000, pag. 137-156.
15. CLARKE J. T. R., A clinical guide to inherited metabolic diseases, Cambridge University Press, Ediţia a 3-a, 2005.
16. COLLINS F., Faces of the Genome, Science 2010, Genetics in Medicine, Vol. X, Nr. XX.
17. COOPER D.N., KRAWCZAK M., ANTONARAKIS S.E., The Nature and Mechanisms of Human Gene Mutation în SCRIVER C., BEAUDET A., SLY W.S., VALLE D., STANBURY J. (Editori) în The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Mc Graw Hill, 2001, 259-262.
18. COOPER D.N., Human gene mutation in pathology and evolution, J. Inherit. Metab. Dis. 2002, 25(3):157-82.
19. CORTÈS-SALADELAFONT E., Tristán-Noguero A., ARTUCH R., ALTAFAJ X., BAYES A, GARCÍA-CAZORLA A., Diseases of the Synaptic Vesicle: A Potential New Group of Neurometabolic Disorders Affecting Neurotransmission, Seminars in Pediatric Neurology 2016, 23(4):306-320.
20. CORTÈS-SALADELAFONT E., LIPSTEIN N., GARCÍA-CAZORLA A. Presynaptic disorders: a clinical and pathophysiological approach focused on the synaptic vesicle. J Inherit Metab Dis. 2018, 41(6):1131-1145.
21. CORTÈS-SALADELAFONT E., MOLERO-LUIS M., CUADRAS D., CASADO M., ARMSTRONG-MORÓN J., YUBERO D., MONTOYA J., ARTUCH R., GARCÍA-CAZORLA A., Gamma-aminobutyric acid levels in cerebrospinal fluid in neuropaediatric disorders, Dev Med Child Neurol 2018; 60(8):780-792.
22. DASHMAN T, SAMUELS S, LESHINSKY SILVER E, KOLODNY E, AXELROD F: Tetrahydrobiopterin (BH_4) cofactor for dopamine beta hydroxylase (D-beta-H). FASEB J. 1997; 11:A1311.
23. DE KONING TJ, KLOMP LW. Serine-deficiency syndromes, Curr Opin Neurol. 2004; 17(2):197-204.
24. DE KONING TJ, SNELL K, DURAN M, BERGER R, POLL-THE BT, SURTEES R., L-serine in disease and development, Biochem J. 2003; 371:653-61.

25. DE KONING TJ, POLL-THE BT, JAEKEN J., Continuing education in neurometabolic disorders - serine deficiency disorders., Neuropediatrics 1999; 30(1):1-4.
26. DE MEIRLEIR L., VAN COSTER R., LISSENS W., Disorders of Mitochondrial Energy Metabolism, în Fernandes, Saudubray, van den Berghe, Walter (Editori), Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment, ediţia a 4-a, Springer, Heidelberg, 2006, pag. 161-173.
27. DARNA KN, SCHMUTZ I, RICHTER K, YELAMANCHILI SV, PENDYALA G, HÖLTJE M, ALBRECHT U, AHNERT-HILGER G., Time of day-dependent sorting of the vesicular glutamate transporter to the plasma membrane, J Biol Chem. 2009; 13, 284(7): 4300-4307.
28. EVANS-MARTIN FAY F., The Neurotransmitters, în Your Body-How it Works, The Nervous System, Chelsea House, 2005, pag. 44-50.
29. FOWLER L., FURMAGA W., Proteomics în P.T. Cagle, T.C. Allen (Editori) Basic Concepts of Molecular Pathology, Springer Science, LLC 2009.
30. FRAYN KN, Metabolic regulation. A human perspective, Blackwell Science Ltd 2003.
31. FREIMER N, SABATTI C, The human phenome project, Nature Genetics 2003, 34(1):15-21.
32. FREEMAN W.H., Stryer's Biochemistry, W.H. Freeman &Co., 1995, 629-650.
33. FUCHS SA, DORLAND L, DE SAIN-VAN DER VELDEN MG, HENDRIKS M, KLOMP LW, BERGER R, DE KONING TJ., D-serine in the developing human central nervous system, Ann Neurol. 2006; 60(4):476-80.
34. GARCIA-CAZORLA ANGELS, ARTUCH RAFAEL, GIBSON K. MICHAEL, Disorders of Neurotransmission în Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment, în J.M. Saudubray, M.R. Baumgartner, J.W. Walter (Eds), Inborn Metabolic Disorders, Diagnosis and Treatment, 2016, Springer, 6th edition, p. 415-427.
35. GARROD A.E, Inborn Errors of metabolism, Lancet 1908; 172, No. 4427:1-7.
36. GARVER DL., Psychiatric disorders, în Kaplan and Pesco (Editori) Clinical Chemistry, C.V. Mosly Comp. St. Louis-Toronto-Princeton 1984, p. 784-881.
37. GALLAGHER RC, VAN HOVE JL, SCHARER G, HYLAND K, PLECKO B, WATERS PJ, MERCIMEK-MAHMUTOGLU S, STOCKLER-IPSIROGLU S, SALOMONS GS, ROSENBERG EH, STRUYS EA, JAKOBS C., Folinic acid-responsive seizures are identical to pyridoxine-dependent epilepsy, Ann Neurol. 2009; 65(5):550-556.

38. GIBSON KM., Gamma-hydroxybutyric aciduria: a biochemist's education from a heritable disorder of GABA metabolism, J Inherit Metab Dis. 2005; 28(3):247-65.
39. GRUBBS ROBERT, Chemical Messenger Systems în Conn, P.M. (ed.) Neuroscience in Medicine, Springer, Totowa, NJ third edition 2008, pag. 479-507.
40. HAMOSH A., JOHNSTON M.V., Nonketotic Hyperglycinemia în SCRIVER C., BEAUDET A., SLY W.S., VALLE D., STANBURY J. (Editori) în *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Mc Graw Hill, 2001, 2065-2075.
41. HANNA-EL-DAHER L, BRAISSAN O., Creatine synthesis and exchanges between brain cells: What can be learned from human creatine deficiencies and various experimental models?, Amino acids, 2016, Vol. 48:8, 1877–1895.
42. HEALY, DAVID, The psychopharmacology of life and death. Interview with Joseph Knoll, The Psychopharmacologists, Vol. III: Interviews. London: Arnold, 2000.
43. HEALES SIMON, Biogenic amines în Blau N., Duran M., Gibson M. (Editori), Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics, Springer 2008.
44. HOFFMAN G.F., Neurotransmitter Defects and Related Disorders in G.F. Hoffmann et al. (eds.), *Inherited Metabolic Diseases*, 2017, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
45. HORVATH GA, STOCKLER-IPSIROGLU SG, SALVARINOVA—ZIVKOVIC R, LILLQUIST YP, CONNOLLY M, HYLAND K, BLAU N, RUPAR T, WATERS PJ., Autosomal recessive GTP cyclohydrolase I deficiency without hyperphenylalaninemia: evidence of a phenotypic continuum between dominant and recessive forms, Mol Genet Metab. 2008; 94(1): 127-31.
46. HYLAND K., The lumbar puncture for diagnosis of pediatric neurotransmitter diseases, Ann Neurol. 2003; 54 Suppl 6:S13-7.
47. HYLAND K, SURTEES RA, HEALES SJ, BOWRON A, HOWELLS DW, SMITH I., Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population, Pediatr Res. 1993; 34(1):10-4.
48. HYLAND K, Clinical utility of monoamine neurotransmitter metabolite analysis in cerebrospinal fluid, Clin Chem. 2008; 54(4):633-41.
49. HYLAND K., Inherited Disorders Affecting Dopamine and Serotonin: Critical Neurotransmitters Derived from Aromatic Amino Acids, J. Nutr. 2007; 137:1568S-1572S.

50. HUGHES BP., The myopathies in Williams and Marks (Editori) în Biochemistry in clinical practice, William Heinemann Medical Book, Limites London 1983, pag. 443-444.
51. ICHINOSE H, NOMURA T, SUMI-ICHINOSE C., Metabolism of tetra-hydrobiopterin: its relevance in monoaminergic neurons and neurological disorders, Chem Rec. 2008; 8(6):378-85.
52. JAEKEN J., DE KONING T., VAN HOVE J., Disorders of GABA, Glycine, Serine and Proline în Blau N., Duran M., Blaskovics M.E., Gibson K.M.(Editori), în Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases, Springer, Ed. a 2-a, 2003, pag. 123-140.
53. JAEKEN J., JAKOBS C., CLAYTON P.T., WEVERS R.A., Disorders of Neurotransmission, în Fernandes, Saudubray, van den Berghe, Walter (Editori), Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment, ediția a 4-a, Springer, Heidelberg, 2006, p. 359-372.
54. JUNJAUD G., ROUAUD E., TURPIN F., MOTHET J.P., BILLARD JM., Age-related effects of the neuromodulator D-serine on neurotransmission and synaptic potentiation in the CA1 hippocampal area of the rat, J Neurochem. 2006; 98(4):1159-66.
55. KAHLER S.G., FAHEY M.C., Metabolic disorders and mental retardation, American Journal of Medical Genetics Part C-Seminars in Medical Genetics, 2003; 117(1):31-41.
56. KANDEL, SCHWARZ, JESSEL, Principles of Neural Science, McGraw-Hill, 1991, ed. a 3-a, pag. 1-150.
57. KANG UJ, NAKAMURA K., Potential of gene therapy for pediatric neuro-wtransmitter diseases: lessons from Parkinson's disease, Ann Neurol. 2003; 54 Suppl 6:103-9.
58. KAZAK L., COHEN P., Creatine metabolism: energy homeostasis, immunity and cancer biology, Nat. Rev Endocrinol. 2020, 16(8):421-436.
59. KIRKWOOD T.B., Molecular gerontology, J Inherit Metab Dis, 2002; 25:189-196.
60. KAUFMAN S: New tetrahydrobiopterin-dependent systems. Annu Rev Nutr. 1993, 13:261.
61. KUSMIERSKA, JANSEN E.E. JAKOB C., SZYMANSKA K., MALUNOWICZ E., MEILEI D., THONY B., BLAU N., TRYFON J., ROKICKI D., PRONICKA, SYKUT-CEGIELSKA J., Sepiapterin reductase deficiency in a 2-year-old girl with incomplete response to treatment during short-term follow-up, JIMD online reports 2009, vol 32 S1: 5-10.
62. KNIGHT AW, SENIOR TP., The common problem of rare disease in general practice, Med J Aust 2006; 17, 185(2):82-3.

63. KOOLMAN J., ROEHM K.H., Color Atlas of Biochemistry, 2nd edition, 2005 Thieme.
64. KRUESI MJ., SWEDO SE., HAMBURGER SD., POTTER WZ., RAPOPORT JL., Concentration gradient of CSF monoamine metabolites in children and adolescents, Biol Psychiatry. 1988; 24(5):507-514.
65. LAMMERT E., ZEEB M., Metabolism of Human Diseases, Organ Physiology and Pathophysiology, Springer, 2014.
66. LANDSBERG L., YOUNG JB., Physiology and Anatomy of the autonomic nervous system, în Harrison's Principles of Internal Medicine 14th ed., McGraw Hill, Inc. New York, 1998, p. 380-392.
67. LEE C.P.J., Growing older: The adult metabolic clinic, J Inherit Metab Dis 2002; 25(3):252-260.
68. LEWIN B., Genes, Oxford University Press and Cell Press, 1997, pag. 65-67, 89-91, 94-95.
69. LIANG M., Integrative pathway knowledge bases as a tool for systems molecular medicine. Physiol Genomics. 2007, 20; 30(3):209-12.
70. LIU YI, ZHAO J., GUO W., Emotional Roles of Monoaminergic Neurotransmitters in Major Depressive Disorder and Anxiety Disorders", Frontiers in psychology, 2018, 21;9:2201.
71. LIU YI, ZHAO J., FAN X, GUO W., Dysfunction in Serotonergic and Noradrenergic Systems and Somatic Symptoms in Psychiatric Disorders, Front Psychiatry, 2019; 21; 10:286.
72. LONGO N., Disorders of biopterin metabolism, J Inherit Metab Dis. 2009; 32(3):333-42.
73. MATTSON MP., Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease, Ann N Y Acad Sci. 2008; 1144:97-112.
74. MCKEE – McKee Biochemistry: The Molecular Bases of Life, 3rd edition, The McGraw-Hill Companies, 2004.
75. MILLS PB., SURTEES RA., CHAMPION MP., BEESLEY CE., DALTON N., SCAMBLER PJ., HEALES SJ., BRIDDON A., SCHEIMBERG I., et al. Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)ine 5'-phosphate oxidase. Hum Mol Genet. 2005; 14:1077–86.
76. MILLS PB, STRUYS E, JAKOBS C, PLECKO B, BAXTER P, BAUMGARTNER M, WILLEMSEN MA, OMRAN H, TACKE U, UHLENBERG B, WESCHKE B, CLAYTON PT., Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures, Nat Med. 2006; 12(3): 307-9.

77. MORAVA E., RAHMAN S., PETERS V., BAUMGARTNER MR., PATTERSON M., ZSCHOCKE J. Quo vadis: the re-definition of "inborn metabolic diseases". *J Inherit Metab Dis.* 2015;38(6):1003–1006.
78. MOTHET JP., ROUAUD E., SINET PM., POTIER B., JOUVENCEAU A., DUTAR P., VIDEAU C., EPELBAUM J., BILLARD JM., A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory, Aging Cell. 2006; 5(3):267-74.
79. MURRAY CJ., LOPEZ AD., Evidence-based health policy-lessons from the Global Burden of Disease Study, Science. 1996; 274:740-3.
80. NAVARRO V., Epilepsy and inborn errors of metabolism in adults: a diagnostic approach, J Inherit Metab Dis. 2007; 30(6):846-54.
81. NELSON D.L., COX M.M., LEHNINGER Principles of Biochemistry, 2004, ed a 4-a.
82. NYHAN W., When to suspect metabolic disease, în Hoffman, Zschocke J., Nyhan W. (Editori) Inherited Metabolic Diseases, A clinical Approach, Springer Verlag, 2006; pag. 15-23.
83. PANDY HK., RIGGS JE, Channelopathies in pediatric neurology, Neurol Clin 2003, 21:765-777.
84. PAOLETTI P., NEYTON J., NMDA receptor subunits: function and pharmacology, Curr Opin Pharmacol. 2007; 7(1):39-47.
85. PARDRIDGE WM., Molecular biology of the blood-brain barrier. Mol Biotechnol. 2005; 30(1):57-70.
86. PEARL P.L., TAYLOR J.L., TRZCINSKI S., SOKOHL A, The Pediatric Neurotransmitter Disorders, Journal of Child Neurology 2007; 22(5):606-616.
87. PEARL PL, CAPP PK, NOVOTNY EJ, GIBSON KM., Inherited disorders of neurotransmitters in children and adults, Clin Biochem. 2005; 38(12):1051-8.
88. PEREZ-CABALLERO L., TORRES-SANCHEZ S., ROMERO-LÓPEZ-ALBERCA C.,F GONZÁLEZ-SAIZ F., MICO J.A:, BERROCOSO E., Monoaminergic system and depression, Cell Tissue Res, 2019; 377(1):107-113.
89. PETRESCU I., Biochimie vol. II, Reacţii chimice în celula vie, Ed. Presa Universitară Clujeană, 1998.
90. PONS R., The phenotypic spectrum of paediatric neurotransmitter diseases and infantile parkinsonism, J Inherit Metab Dis. 2009; 32(3):321-32.
91. PONS R., COLLINS A., ROTSTEIN M., ENGELSTAD K., DE VIVO DC., The spectrum of movement disorders in Glut-1 deficiency, Mov Disord. 2010, 15;25(3):275-81.

92. PUNEKAR N.S., Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms, Springer 2019.
93. RODAN V.T., Gibson K.M., Pearl P.L., Clinical use of CSF Neurotransmitters erebral folate deficiency, Pediatric Neurology 53 (2015) 277-286.
94. ROSENBERG LE., Legacies of Garrod's brilliance. One hundred years-and counting, J Inherit Metab Dis. 2008; 31(5):574-9.
95. ROTSTEIN M., KANG U.J., Consideration of gene therapy for paediatric neurotransmitter diseases, J inherit Metab Dis, 2009, 32:387-394.
96. SANTER R, KLEPPER J., Disorders of Glucose Transport, în Fernandes, Saudubray, van den Berghe, Walter (Editori), Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment, Ed. a 4-a, Springer, Heidelberg, 2006, pag.153-158.
97. SARAFOGLOU K., HOFFMANN G., ROTH K.,, Pediatric Endocrinology and Inborn Errors of Metabolism, Second Edition, McGrawHill, 2017.
98. SAUDUBRAY J.M., CHARPENTIER C., Clinical phenotypes: Diagnosis/ Algorithms în SCRIVER C., BEAUDET A., SLY W.S., VALLE D., STANBURY J. (Editori) în *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Mc Graw Hill, 2001, pag. 1327-1397.
99. SAUDUBRAY J.M, GARCIA CAZORLA A., An overview of inborn errors of metabolism affecting the brain: from neurodevelopment to neurodegenerative disorders, Dialogues Clin Neurosci 2018; 20(4):301-325.
100. SAUDUBRAY J.M, GARCIA CAZORLA A , Cellular neurometabolism: a tentative to connect cell biology and metabolism in neurology, Journal of Inherited Metabolic Disease 2018, **41**: 1043–1054
101. SAUDUBRAY J.M, MOCHEL, F., LAMARI, F., & GARCIA CAZORLA A. (2019), Proposal for a simplified classification of IMD based on a pathophysiological approach: a practical guide for clinicians. Journal of Inherited Metabolic Disease 2019; 42:706–727
102. SAUDUBRAY J.M., BAUMGARTNER M.R., WALTER J.W. (Eds), Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment, 6th edition Springer 2016.
103. SCRIVER CH., HUMAN GENETICS: Lessons from Quebec Populations, Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2001, 2:69-101.
104. SCRIVER CH., The human genome project will not replace the physician, CMAJ, 2004; 171(12):1461-4.
105. SCRIVER C.R., Does hereditary metabolic disease modulate senescence and ageing? J Inherit Metab Dis. 2002, 25(3): 235-51.
106. SCRIVER, C. R., After the genome-the phenome? J Inherit Metab Dis 2004; 27(3):305-17.

107. SMITH A.D., DATA S.P., SMITH G.H., CAMPBELL P.N., BENTLEY R., MCKENZIE H.A., BENDER D.A., HARRIS A.J., GOODWIN T.W., PARISH J.H., STANFORD C.(Editori), Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press 2000.
108. SMITH C., MARKS A., LIBERMAN M., PEET A., Mark's Basic Medical Biochemistry, A clinical Approach, 2nd, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2004, 2017.
109. STEINER PASCAL, Brain Fuel Utilization in the Developing Brain, Annals of Nutrition and Metabolism, 2020, DOI: 10.1159/000508054
110. STOCKLER-IPSIROGLU S, APATEAN D, BATTINI R, et al. Arginine: Glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency: Clinical features and long term outcomes in 16 patients diagnosed worldwide. *Mol Genet Metab*. 2015;116(4):252-259.
111. THÖNY B, AUERBACH G, BLAU N., Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions, Biochem J. 2000; 347, 1:1-16.
112. VAN HOVE JL, HENNERMANN JB, Nonketotic Hyperglycinemia (Glycine encephalopathy) and lipoate deficiency disorders în J.M. Saudubray, M.R. Baumgartner, J.W. Walter (Eds), Inborn Metabolic Disorders, Diagnosis and Treatment, 2016, Springer, 6th edition, pag 349-356.
113. VAN OMMEN G.J.B., The Human Genome Project and the future of diagnostics, treatment and prevention, J Inherit Metab Dis 2002; 25(3):183-188.
114. VON WENDT L., SIMILÄ S., HIRVASNIEMI A., SUVANTO E., Altered levels of various amino acids in blood plasma and cerebrospinal fluid of patients with nonketotic hyperglycinemia, Neuropadiatrie. 1978; 9(4):360-368.
115. VULTURAR R., LUPEA I., BENGA GH., Considerations about a case with congenital lactic acidemia and high excretion of citrulline, proline, lysine and pipecolic acid, JIMD 2004, J. Inherit. Metab. Dis. 27 2004, Suppl. I, pag. 114.
116. VULTURAR R., CUCUIANU M., Aminoacidopatii: aspecte genetice, biochimice și clinice, Ed. Casa Cărții de Știință, 2011.
117. VULTURAR R., BENGA I., GERLO E., BENGA G., Metabolic, nutritional and artifactual sources of changes in urinary and plasma amino acids: a comprehensive approach, J. Inherit. Metab. Dis. 2006, Vol.29, Suppl. 1, pag. 88.

118. WILKINSON S.T., SANACORA G., A new generation of antidepressants: an update on the pharmaceutical pipeline for novel and rapid-acting therapeutics in mood disorders based on glutamate/GABA neurotransmitter systems, Drug Discovery Today 2019, Vol 24(2): 606-615.
119. WILLIAMS DL., GOODBURN R., Biochemistry in clinical practice, William Heinemann Medical Book, Limites London 1983.
120. WILLIAM L. NYHAN, BRUCE A. BARSHOP, PINAR T. OZAND, Atlas of Metabolic Diseases, 2005, second edition, Hodder Arnold, p. 183-189.
121. WHITE A., HANDLER P., SMITH L., Principles of biochemistry (5th edition, McGraw-Hill, Book Company) A Blakiston Publication New York, St Louis, San Francisco, Düsseldorf, Johannesburg, Kuala-Lumpur, London, Mexico, Montreal, New Delhi, Panama, Rio de Janeiro, Singapore, Sydney, Toronto 1973; pag. 970-973.
122. WOLOSKER H., DUMIN E., BALAN L., FOLTYN VN., D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration, FEBS J. 2008; 275(14):3514-26.
123. ZSCHOCKE J., HOFFMAN G., Vademecum metabolicum, Diagnosis and Treatment of Inherited Metabolic Disorders, Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 2020.



ISBN 978-606-37-1143-5